

# GELATINASAS (MMP-2, MMP-9) E INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASAS TIPO 2 (TIMP-2) COMO MARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE VEJIGA



TESIS DOCTORAL

FERNANDO RAMÓN DE FATA CHILLÓN

Madrid, 2013









Universidad  
de Alcalá

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, CIENCIAS MÉDICAS Y  
SOCIALES

UNIDAD DOCENTE DE CIRUGÍA

Campus Universitario

28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Teléfono: 91 885 48 81

Fax: 91 885 4714

[dpto.cirumedsoc@uah.es](mailto:dpto.cirumedsoc@uah.es)

**D. Manuel Sánchez Chapado**, Catedrático de Universidad del Departamento de Cirugía,  
Ciencias Médicas y Sociales de la Universidad de Alcalá,

**D. Javier Angulo Cuesta**, Profesor Asociado de Ciencias de la Salud del Área de Urología de la  
Universidad Europea de Madrid

y

**D. Miguel Ángel Delgado Millán**, Profesor Asociado de Ciencias de la Salud del Área de Cirugía  
de la Universidad Europea de Madrid

Como Directores de la presente Tesis Doctoral

#### CERTIFICAN

Que el trabajo titulado "GELATINASAS (MMP-2, MMP-9) E INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASAS TIPO 2 (TIMP-2) COMO MARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE VÉJIGA" realizado por **D. Fernando Ramón de Fata Chillón** reúne los requisitos metodológicos y valor científico adecuados como para ser presentado y defendido para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a nueve de septiembre de dos mil trece.









Universidad  
de Alcalá

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, CIENCIAS MÉDICAS Y  
SOCIALES

UNIDAD DOCENTE DE CIRUGÍA

Campus Universitario

28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Teléfono: 91 885 48 81

Fax: 91 885 4714

[dpto.cirumedsoc@uah.es](mailto:dpto.cirumedsoc@uah.es)

**D. FERNANDO NOGUERALE FRAGUAS**, Catedrático de Cirugía y Director del Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales de la Universidad de Alcalá

#### CERTIFICA

Que el trabajo presentado por **D. Fernando Ramón de Fata Chillón** titulado "GELATINASAS (MMP-2, MMP-9) E INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASAS TIPO 2 (TIMP-2) COMO MARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE VEJIGA" ha sido realizado en el Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales y reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos suficientes para poder ser presentado como tesis doctoral ante el tribunal que corresponda.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a nueve de septiembre de dos mil trece.





**GELATINASAS (MMP-2, MMP-9) E INHIBIDOR TISULAR  
DE METALOPROTEINASAS TIPO 2 (TIMP-2) COMO  
MARCADORES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN  
EL CÁNCER DE VEJIGA.**

**TESIS DOCTORAL**

**D. FERNANDO RAMÓN DE FATA CHILLÓN**

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, CIENCIAS MÉDICAS Y SOCIALES  
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ



**DIRECTORES**

MANUEL SÁNCHEZ CHAPADO  
JAVIER ANGULO CUESTA  
MIGUEL ANGEL DELGADO MILLÁN



## **DEDICATORIA:**

A Ruth, con todo mi amor, por su cariño, comprensión y paciencia

A mis hijos, Ruth, Claudia y Fernando, por haber aguantado que su padre trabajara, mientras ellos querían jugar, por eso este trabajo es también suyo

A mi padre, con enorme admiración, principal motivo de mi vocación médica

A mi madre, por dedicarnos tanto tiempo y enseñarnos el valor del trabajo bien hecho

A mi tío, Francisco Chillón, modelo de dedicación a sus pacientes, fin principal de nuestra profesión



## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Javier Angulo Cuesta la enorme ayuda prestada en la dirección y elaboración de esta Tesis Doctoral, por la oportunidad profesional que me ha dado, así como la confianza depositada en mi, en el día a día.

A D. Antonio Ferruelo Alonso, biólogo de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Getafe por su inestimable ayuda y colaboración.

A todos mis compañeros del Servicio de Urología del Hospital Universitario de Getafe, pero de forma muy especial a los médicos internos residentes que han colaborado de forma directa o indirecta en la elaboración de éste trabajo.

Al Dr. Oscar Rodríguez Faba, pionero en este campo de conocimiento, por su ayuda.

Agradecer a Juan Dorado (Project Manager, Biostatistics, PeRTICA) por el apoyo estadístico y a José Domínguez (Servicio de Documentación Médica, Hospital Universitario de Getafe) por el soporte iconográfico.

Gracias a la beca otorgada por la Fundación para la Investigación en Urología (FIU) y a la ayuda de IPSEN Pharma, que han financiado este proyecto, permitiendo la adquisición de material de laboratorio y reactivos.



## LISTADO DE ABREVIATURAS

**ABC:** Área Bajo la Curva

**ACS:** *American Cancer Society*

**ADC:** Coeficiente de Difusión Aparente

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**AIGF:** Factor de Crecimiento Inducido por Andrógenos

**AJCC:** *American Joint Committee on Cancer*

**APC:** *Annual Percent Change*

**APU:** Plasminógeno Urokinasa

**APUR:** Receptor Plasminógeno Urokinasa

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**BCG:** Bacilo de Calmette y Guérin

**bFGF:** Factor Fibroblástico de Crecimiento Básico

**BTA:** Bladder Tumor Antigen

**CBD:** Collagen Binding Domain

**CCTTUS:** Carcinoma de Células Transicionales del Tracto Urinario Superior

**Cis:** Carcinoma “in situ”

**CK20:** Citoqueratina 20

**Ct:** *Cycle Treshold*

**DFD:** Diagnóstico Fotodinámico

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**ELISA:** *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*

**EORTC:** *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

**FDG:** <sup>18</sup>F-Fluordesoxiglucosa

**FG:** Filtrado Glomerular

**FSN:** Fibrosis Sistémica Nefrogénica

**FXD3:** *FXD domain-containing ion transport regulator 3*

**GAF:** Factor Activador de la Glía

**GSTMI:** Glutación S-transferasa M1

**HAL:** Hexaminolevulinato

**HBGFs:** Factores de Crecimiento de Unión a la Heparina

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**IL-8:** Interleukina-8

**ISUP:** *International Society of Urological Pathology*

**MEC:** Matriz Extracelular

**MMC:** Mitomicina-C

**MMP-2:** Metaloproteinasa 2

**MMP-3:** Metaloproteinasa 3

**MMP-9:** Metaloproteinasa 9

**MMP-13:** Metaloproteinasa 13

**MMPs:** Metaloproteinasas

**MRI-DW:** *Magnetic Resonance Imaging-Diffusion Weighted*

**MT-MMPs:** Metaloproteinasas de Membrana

**M-VAC:** Mitomicina, Vinblastina, Adriamicina y Cisplatino

**NAT1:** N-acetiltransferasa 1

**NAT2:** N-acetiltransferasa 2

**NCCN:** *National Comprehensive Cancer Network*

**NMP-22:** *Nuclear Matrix Protein 22*

**NUPBPM:** Neoplasia Urotelial Papilar de Bajo Potencial Maligno

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*

**PET:** Tomografía de Emisión de Positrones

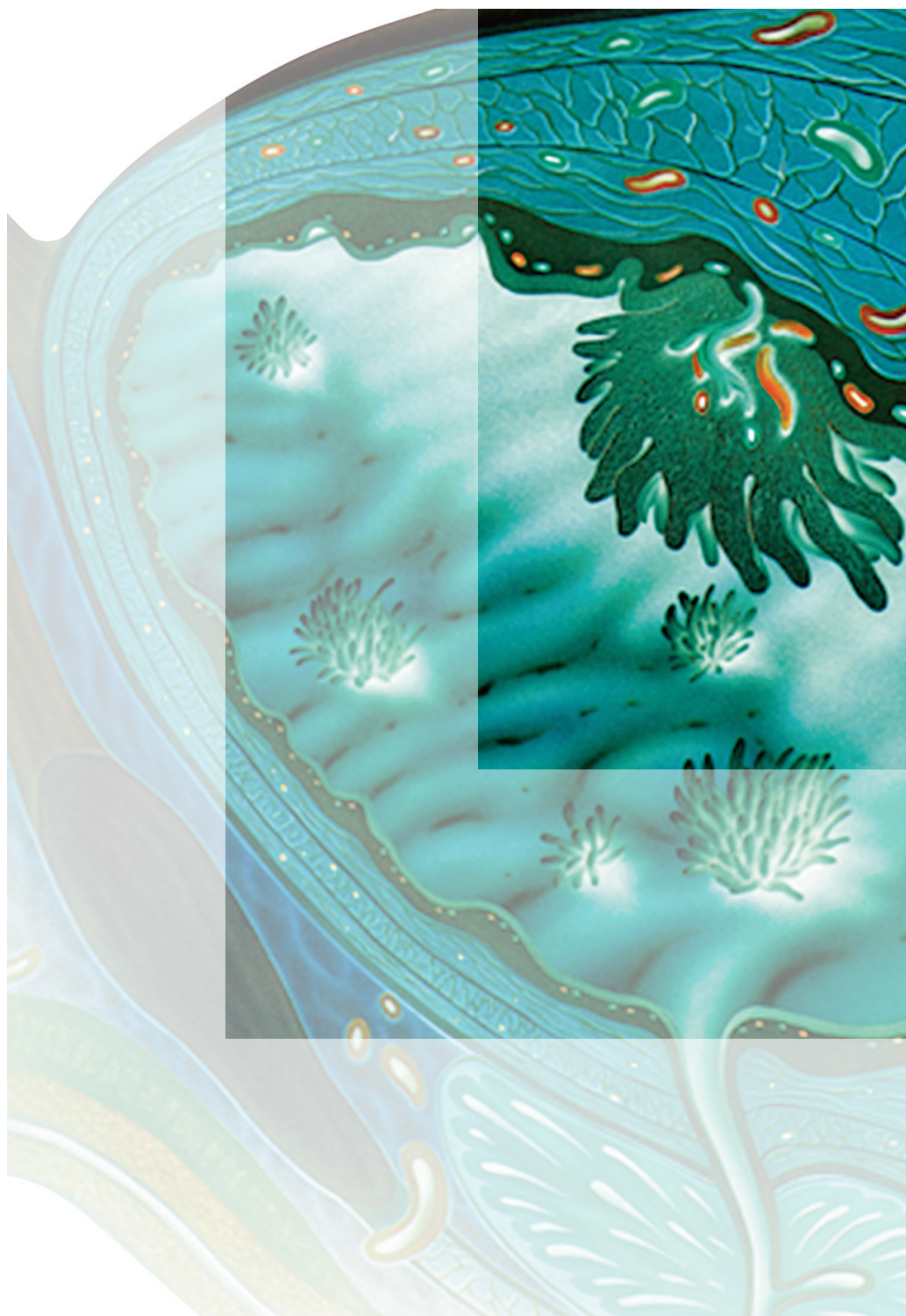
**PET-TAC:** Tomografía de Emisión de Positrones-Tomografía Axial

Computerizada

**PSA:** *Prostate Specific Antigen*

**Q1:** primer Cuartil  
**Q2:** segundo Cuartil  
**Q3:** tercer Cuartil  
**RM:** Resonancia Magnética  
**ROC:** Curva Receptor Operador  
**RTU:** Resección Transuretral  
**RT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa mediante Transcriptasa Inversa  
**SEER:** *Surveillance, Epidemiology and End Results*  
**SCE:** Supervivencia Cáncer Específica  
**SLP:** Supervivencia Libre de Progresión  
**SLR:** Supervivencia Libre de Recurrencia  
**TAC:** Tomografía Axial Computerizada  
**TC:** Tomografía Computerizada  
**TGF- $\alpha$ :** Factor Transformante  $\alpha$   
**TIMPI:** Inhibidor Tisular de MMP2  
**TIMP2:** Inhibidor Tisular de MMP9  
**TIMPs:** Inhibidores Endógenos Tisulares de Metaloproteinasas  
**Tis:** Tumor in situ  
**TPS:** Polypeptide Specific Antigen  
**UICC:** Unión Internacional Contra el Cáncer  
**UIV:** Urografía Intravenosa  
**UPII:** Uroplaquina 2  
**VEGF:** Vascular Endotelial Growth Factor  
**VLMM:** Virus de la Leucemia Murina de Moloney  
**VPH:** Papilomavirus Humano  
**5-ALA:** 5-Ácido Aminolevulínico





# INDICE

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL CÁNCER VESICAL

- I.1.1. Incidencia y prevalencia
- I.1.2. Mortalidad cáncer específica
- I.1.3. Etiopatogenia del cáncer vesical

### I.2. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE VESIGA

- I.2.1. Formas clínicas de la enfermedad
- I.2.2. La predicción de pronóstico en el cáncer vesical
- I.2.3. La terapéutica del cáncer vesical

### I.3. DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER VESICAL

- I.3.1. Clasificación del cáncer vesical
- I.3.2. Cáncer vesical y métodos de imagen
- I.3.3. El proceso metastásico en el cáncer vesical

### I.4. LA REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

- I.4.1. La familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs)
- I.4.2. Metaloproteinasa de la matriz tipo 2 (MMP-2)
- I.4.3. Metaloproteinasa de la matriz tipo 9 (MMP-9)
- I.4.4. Inhibidor tisular de metaloproteinasa tipo 2 (TIMP-2)
- I.4.5. Papel diagnóstico y pronóstico de MMPs y TIMP-2 en la enfermedad neoplásica
- I.4.6. Nuevos abordajes terapéuticos con inhibidores sintéticos de MMPs.

### I.5. EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER DE VESIGA

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO**

- 2.1.1 Hipótesis conceptual
- 2.1.2 Hipótesis operativa

### **2.2 OBJETIVOS PROPUESTOS**

- 2.2.1. Objetivo principal
- 2.2.2. Objetivos secundarios

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 SUJETOS A ESTUDIO**

- 3.1.1. Pacientes
- 3.1.2. Controles

### **3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

- 3.2.1. Suero
- 3.2.2. Células de sangre periférica
- 3.2.3. Tejido tumoral

### **3.3 DETERMINACIÓN PROTÉICA EN SUERO (ELISA)**

### **3.4 EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA**

- 3.4.1. Extracción del ARNm
- 3.4.2. Reacción de la transcriptasa inversa (RT)
- 3.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- 3.4.4. PCR a tiempo real

### 3.5 MÉTODO ESTADÍSTICO

- 3.5.1. Estadística descriptiva
- 3.5.2. Comparación de medianas (U-Mann Whitney, Kruskal Wallis)
- 3.5.3. Análisis de curvas receptor operador (ROC)
- 3.5.4. Análisis de supervivencia (Método de Kaplan-Meier)
- 3.5.5. Comparación de niveles de expresión génica (Método  $\Delta\Delta CT$  comparativo)

## 4. RESULTADOS

- 4.1 CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE
- 4.2 NIVELES PROTÉICOS DE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 EN SUERO
- 4.3 DETECCIÓN DE CÁNCER BASADA EN NIVELES PROTÉICOS
- 4.4 ESTADIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD SEGÚN NIVELES PROTÉICOS
- 4.5 ANÁLISIS DE EXACTITUD DIAGNÓSTICA Y ESTABLECIMIENTO DE PUNTOS DE CORTE DE NIVELES PROTÉICOS
- 4.6 EVALUACIÓN DE PRONÓSTICO SEGÚN NIVELES PROTÉICOS

- 4.6.1. Supervivencia cáncer específica
- 4.6.2. Recurrencia y Progresión para tumores no músculo-invasivos

- 4.7 DETECCIÓN DE CÁNCER BASADA EN NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm DE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA
- 4.8 ESTADIFICACIÓN MOLECULAR BASADA EN NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm DE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA
- 4.9 PROPUESTA DE UN ÍNDICE PARA AUMENTAR LA CAPACIDAD DE ESTADIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL

## 5. DISCUSIÓN

## 6. CONCLUSIONES

## 7. BIBLIOGRAFÍA

### ANEXO I. BASE DE DATOS.

### ANEXO II. PRINCIPALES ARTICULOS PUBLICADOS





## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL CÁNCER DE VEJIGA

A pesar del descenso en la incidencia y mortalidad por cáncer desde el comienzo de los años 90, la *American Cancer Society* (ACS) estima que en Estados Unidos se diagnosticaron durante el año 2001 un total de 1.268.000 nuevos cánceres, lo que causó un total de 553.400 muertes [1].

El cáncer de vejiga es el cuarto cáncer en frecuencia entre los hombres y el octavo en frecuencia entre las mujeres, representando el 10% y el 4% de todos los cánceres en cada género, respectivamente. En los varones de nuestro entorno su frecuencia solo la superan las neoplasias prostáticas, pulmonares y colorrectales. En términos de frecuencia global podemos reconocer que el cáncer de vejiga es responsable del 6,2% de todos los tumores malignos del varón y del 2,5% de los tumores malignos de la mujer [2].

#### I.1.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La incidencia del cáncer de vejiga es extremadamente variable y dependiente de la zona geográfica, raza, edad, y sexo, entre otros factores. Los territorios con más riesgo incluyen aquellas zonas en donde la exposición al humo del tabaco y tóxicos medioambientales son muy patentes; es decir, en Europa y en América del Norte [3]. La densidad de incidencia se define como el número de nuevos casos diagnosticados por 100.000 habitantes en un determinado tiempo (generalmente en un año). En los Estados Unidos se calcula que 57.400 personas (42.200 varones y 15.200 mujeres) desarrollan cáncer vesical cada año y que 12.500 individuos (8.600 varones y 3.900 mujeres) morirán por esta causa [2]. Los datos estimados para el 2012, son 73.510 nuevos casos (55.600 varones y 17.910 mujeres) y 14.880 fallecimientos debidos a la enfermedad. Se aprecia una tendencia levemente ascendente en la incidencia de este

tumor a lo largo de las tres últimas décadas y para ambos sexos. También se aprecia que existe diferencia en la incidencia del tumor vesical respecto a la raza, siendo más frecuente en blancos. Asimismo existen diferencias si se analiza a lo largo del tiempo la incidencia del cáncer vesical por sexos [4].

Ahora bien, para poder comparar correctamente desde el punto de vista epidemiológico la tendencia de una patología a lo largo del tiempo hay que tener en cuenta la población general de cada periodo de tiempo y ajustarla tanto a la edad (pirámide poblacional mundial), como al sexo y a la raza. De esta manera, mediante una fórmula matemática se halla el cambio porcentual anual APC (*annual percent change*), y mediante este índice se pueden comparar las tendencias a lo largo del tiempo. Así pues, para el tumor de vejiga se ha objetivado que, aunque desde 1975 hasta el 2001 todas las razas han aumentado su incidencia, la raza negra ha disminuido su incidencia en los últimos tres años. Por sexos, llama la atención la disminución en mujeres en el periodo de 1992 al 2001, aunque a este hecho no se le ha encontrado una clara explicación. Aún con todo, permanece una tendencia general global en los últimos 30 años a seguir aumentando su incidencia.

Entre 1985 y 2000 se ha incrementado en un 33% el número de nuevos casos diagnosticados en EEUU tanto en varones como en mujeres [5]. Dado que no ha aumentado su incidencia en necropsias [6] y que se sigue diagnosticando igual que hace 60 años, no se puede atribuir este aumento ni a mejoras sanitarias o tecnológicas, ni a cambios en estrategias de salud pública (campañas anti-tabaco)[7]. Como la incidencia del cáncer vesical se incrementa con la edad en ambos sexos, el relativo aumento por igual de la incidencia sería contrario a lo esperable teniendo en cuenta la mayor expectativa de vida (casi 5 años) [8]. Es sorprendente que en las mujeres no se haya producido un aumento en su incidencia como el que se produjo en los Estados Unidos con el cáncer de pulmón cuando a partir de finales de los años sesenta tuvo lugar la incorporación de las mujeres al mundo laboral. Este hecho apoya la hipótesis de que existen otros factores, además de la exposición a tóxicos

medioambientales, (ej. tabaco) que juegan un importante papel en la incidencia de esta enfermedad [5,9,10].

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) España estaría en el tercer puesto en incidencia ajustada por edad de cáncer vesical (28.35 por 100,000 habitantes) [11]. Únicamente Israel y Egipto se encuentran por delante en esta lista. En general, las mayores incidencias se encuentran en países occidentales, mientras que las más bajas se encuentran en Asia y en América del Sur. Ahora bien, si se analizan las cifras con detenimiento podemos decir que los datos de incidencia españoles están en concordancia con las cifras americanas, y que varían desde un 21,7 casos por 100,000 habitantes en la provincia de Cuenca [12] hasta un 29,57 casos por 100.000 habitantes en el antiguo distrito denominado área sanitaria 10 de Madrid (Getafe) [3]. También se ha confirmado en nuestro entorno una tendencia anual de incremento en la incidencia del tumor vesical. Según datos recogidos en un área industrial española, el área sanitaria 10 de Madrid, que corresponde al Hospital Universitario de Getafe, entre el año 1991 y el 2003 se aprecia un cambio porcentual anual según la tasa de incidencia ajustada a la pirámide de población mundial (APC) de +1,64; aunque esta diferencia no alcanzó niveles significativos (datos no publicados). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los Estados Unidos, en España no se ha objetivado una disminución en los últimos años de la incidencia en varones [3].

Curiosamente, no sólo es así sino que además se ha producido una leve tendencia ascendente en las mujeres, aunque sin llegar a alcanzar significación estadística. De la misma forma, en un área rural española como es la provincia de Cuenca, se ha apreciado desde 1985 un aumento drástico de la incidencia del cáncer vesical, fundamentalmente a costa de los varones, desde una tasa de 10,49 a la actual de 21,3 tumores por cada 100.000 habitantes [12].

Pero no sólo debemos tener en cuenta la incidencia de esta enfermedad, sino también su prevalencia. Se define prevalencia como el total de los pacientes

que presentan este tumor en una población dada y en un tiempo en concreto. Los datos del SEER respecto a este tumor, definiendo la prevalencia como el número de pacientes vivos con esta enfermedad en un plazo mayor de 25 años del diagnóstico, señalan que para la raza blanca en este plazo estarán vivos 434.668 pacientes, fundamentalmente varones. En el otro extremo, las mujeres de raza negra solo presentan una prevalencia de 5.224 en ese mismo plazo [4].

Si se compara con otras neoplasias urológicas la prevalencia del cáncer de vejiga es relativamente alta. Respecto al tumor testicular el cáncer de vejiga es 3 veces más prevalente, aunque también lo es 3,5 veces menos que el cáncer de próstata. Pero si se compara con otras neoplasias no urológicas frecuentes debemos señalar que el cáncer de mama es 4,5 veces más prevalente que el cáncer vesical y el colorrectal 2,11 veces, mientras que el cáncer de pulmón es 1,5 veces menos prevalente debido a su alta tasa de mortalidad.

Esta relativamente alta prevalencia del cáncer vesical puede estar en gran medida condicionada por la alta tasa de recurrencias que muestra la enfermedad en los tumores superficiales. Es decir, pocos pacientes morirán por esta causa y el número de casos vivos se acumulará en el tiempo. Hasta tal punto es así que a pesar de que el cáncer vesical sea el cuarto en frecuencia en los Estados Unidos, representa el segundo en prevalencia entre los varones de mediana edad después del cáncer de próstata [13]. La mayor prevalencia se alcanza entre los 75 y 79 años para ambos sexos, pero se aprecia una disminución significativa en las mujeres en todos los intervalos de edad con respecto a los varones [4].

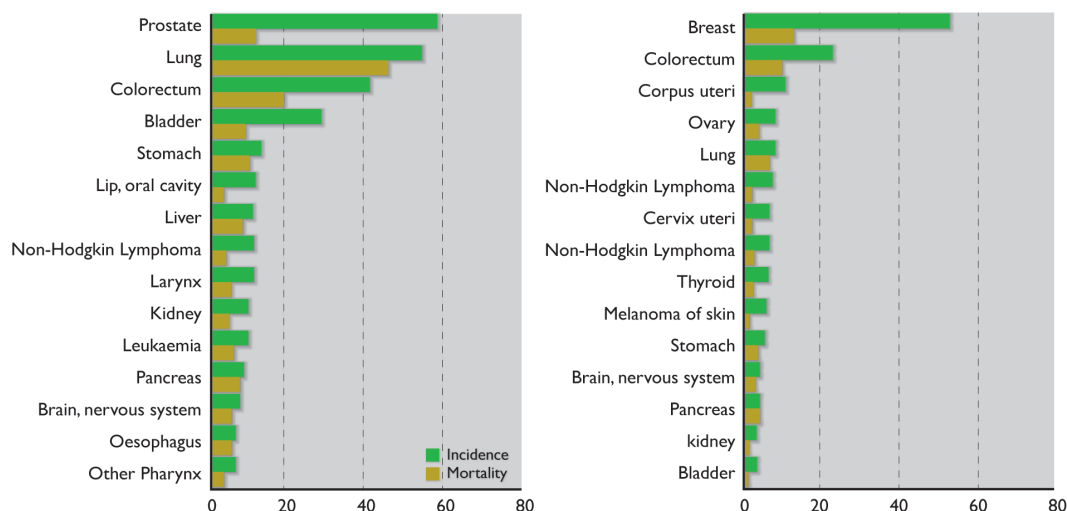
### 1.1.2 MORTALIDAD CÁNCER ESPECÍFICA

La tasa de mortalidad se define como el número de fallecimientos producidos por ese cáncer por cada 100.000 habitantes y en el plazo de un año. En el 2000, el cáncer vesical fue responsable de 12.200 fallecimientos (8.100 varones y 4.100 mujeres), convirtiéndose así en la séptima causa más frecuente de fallecimiento en la población

norteamericana. El 3% de todos los varones y el 1,5% de las mujeres de los Estados Unidos fallecen por un cáncer vesical infiltrante [5], a pesar de todos los esfuerzos terapéuticos empleados para impedir o retrasar el paso de cáncer superficial a invasivo. En todo el mundo el cáncer vesical es la causa de 130.000 fallecimientos/año, lo que supuso en 1999 el 10,5% de todos los fallecimientos [3].

La tasa de mortalidad ajustada por edad en los Estados Unidos durante el periodo comprendido entre 1990 y 2001, para todas las razas y ambos sexos, fue de 4,39 (4,36-4,41) por cada 100.000 habitantes [4]. Los varones presentan una mayor tasa de supervivencia a 5 años que las mujeres, siendo particularmente significativa esta diferencia en las mujeres afroamericanas (71% para los varones afroamericanos y 51% para las mujeres del mismo grupo) [14]. Entre los factores postulados para explicar esta diferencia se incluyen: posible infradiagnóstico, retraso en el diagnóstico, e inusitadamente alta frecuencia de las variantes más agresivas de tumores vesicales de células transicionales en esta raza; aunque de todas estas teorías la menos plausible es la primera.

La tendencia registrada en las últimas décadas, detecta un descenso en la tasa de mortalidad, fundamentalmente a costa de los varones y en los últimos 4 años del periodo de datos recogido (1997-2001) [4]. También ha descendido el APC de la tasa de mortalidad en la raza negra y blanca comparada por sexos [4,14]. Las tendencias en mortalidad y el aumento de incidencia en varones respecto a mujeres sugieren que las diferencias en el diagnóstico, tratamiento y las diferentes características tumorales entre varones y mujeres explicarían la mayor probabilidad de las mujeres (50%) de morir por un cáncer vesical a pesar de su mayor expectativa de vida (SEER, 1973–1997) [4,15]. Dado que la incidencia de esta enfermedad sigue aumentando en las últimas décadas, tal y como hemos visto anteriormente, y que existe una tendencia a disminuir la mortalidad (sobre todo a costa de los varones) es previsible que se produzca un aumento en la prevalencia de este tumor, con lo que cada vez queda de manifiesto el importante problema de salud que representa y su impacto en la esperanza de vida [16,17].



**Figura 1.** Incidencia y Mortalidad del cáncer vesical en España durante 2013 (GLOBOCAN).

La expectativa de vida se ha incrementado sustancialmente a lo largo del último siglo. Al comienzo del siglo XX sólo el 25% de los americanos vivían hasta los 65 años de edad; actualmente, el 70% alcanzan esa edad, y el 30 % incluso la octava década de la vida. Según los datos del SEER, la incidencia del cáncer vesical es tanto más alta cuanto mayor es la edad poblacional [4]. Hoy en día, en muchos países occidentales la expectativa de un niño al nacer se acerca a los 80 años [18] y para el año 2.020 se espera un incremento mayor del 200% para la población con más de 65 años de edad [19]. El cáncer vesical aumenta su incidencia con la edad y esto explica en parte el incremento de esta neoplasia en España en los últimos años.

No obstante, esta neoplasia es mucho más frecuente en hombres que en mujeres. Según datos de la OMS (Globocan) supone el cuarto cáncer en términos de incidencia en el varón, y el decimoquinto en la mujer (Figura 1) [4,15]. Posiblemente, las recientes medidas incorporadas basadas en la prohibición del hábito tabáquico en lugares públicos supondrán en el futuro una estabilización de la enfermedad.

### 1.1.3. ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER VESICAL

El cáncer vesical destaca entre todas las neoplasias humanas por la gran cantidad de factores etiológicos identificados que se relacionan con su patogenia. Para todos estos factores, el proceso de carcinogénesis abarca desde la inducción de una alteración en el ADN, a la interferencia de los mediadores de la apoptosis, pasando por la alteración de los controles de la replicación celular, lo que finalmente dar lugar a una célula transformada capaz de escapar a los controles locales de proliferación y de vigilancia inmunológica [20].

Aunque se han comunicado familias con cáncer vesical [21] no se ha evidenciado realmente la existencia de una asociación fuerte epidemiológica entre esta enfermedad y su factor hereditario. Se han identificado muchos factores epigenéticos responsables de desarrollar y promover el cáncer vesical. Muchos de estos factores son ocupacionales, pero otros se asocian a hábitos como el tabaquismo y a la dieta. Describimos a continuación los factores que se consideran más influyentes en el inicio y desarrollo del cáncer vesical.

La exposición ocupacional se considera responsable de casi el 20-25% de los cánceres vesicales que se registran en los Estados Unidos. Esta exposición presenta periodos de latencia característicamente largos, de 20 a 30 años, que se pueden acortar aumentando la intensidad a dicha exposición [22]. Se conoce gran variedad de profesiones con riesgo a padecer la enfermedad, generalmente debido al contacto con productos químicos [23]. La mayoría de los carcinógenos vesicales son aminas aromáticas. Ahora bien, también se han identificados factores nutricionales como la ingestión de nitratos y nitritos que la flora bacteriana intestinal metaboliza en otros productos con capacidad carcinogénica [24].

En 1895, Rehn describió por primera vez cáncer de vejiga en trabajadores de la industria del tinte [25]. Posteriores trabajos demostraron que se debía a la producción de beta-naftilamina, un carcinógeno que dejó de producirse en el Reino



Unido en 1950, aunque la producción mundial no cesó hasta 1972. La producción de otros productos relacionados como la bencidina y otros derivados, que también fueron relacionados directamente con el cáncer adquirido ocupacional de la vejiga urinaria, cesó a nivel mundial en torno a 1956. Numerosos estudios de caso control llevados a cabo en diversos lugares del mundo han reflejado aumento del riesgo relativo en al menos veintitrés ocupaciones en las industrias [26,27] (TABLA I).

1.	Industria química. La mayoría del riesgo se puede reducir mejorando las prácticas de trabajo. Algunas compañías institucionalizan seguimiento regular mediante citología.
3.	Producción de cables.
4.	Laminación del hierro.
5.	Refinamiento del aluminio.
6.	Industria del plástico y laboratorios industriales que emplean grandes cantidades de plásticos.
7.	Departamentos de Anatomía Patológica de los hospitales.
8.	Imprentas.
9.	Manipuladores de roedores.
10.	Trabajadores del cuero.
11.	Peluqueros.
12.	Pintores profesionales y productores de pinturas.
13.	Trabajadores con máquinas que emplean combustión.
14.	Industria del petróleo.

No cabe duda que el consumo de cigarrillos supone la causa aislada más importante para desarrollar cáncer de vejiga y que los fumadores presentan un riesgo entre dos y cuatro veces más elevado de sufrir la enfermedad que la población general [28]. El humo de los cigarrillos presenta aldehídos insaturados y aminas aromáticas que parecen ser los principales responsables de este riesgo. Entre los diferentes tipos de tabaco aquel secado al aire en su producción (tabaco negro) presenta mayor riesgo de producir cáncer de la vejiga urinaria que el que se seca en estufas (tabaco rubio) [20]. Sabemos también que el aumento del riesgo de

los sujetos fumadores continúa durante varios años; más concretamente entre 12 y 15 años después de abandonar el hábito [28].

Aunque Thompson y cols [29] demostraran una correlación entre el tabaco y el grado histológico, el estadio, número y tamaño de los tumores vesicales, otros autores no han podido corroborar estos hallazgos [30]. Las diferencias encontradas en los diferentes trabajos pueden ser explicadas por los diferentes tipos de degradación de las aminas aromáticas. Las dos vías principales de degradación son la vía de la N-acetilación y la de la N-hidroxilación. Los productos de la primera vía no son carcinógenos mientras que los productos de la segunda si lo son. La enzima clave en la primera vía es la N-acetiltransferasa 2 (NAT2) y existen dos genotipos para esta enzima, que resultan en dos tipos de sujetos, los “acetiladores lentos” y los “acetiladores rápidos”. Como los compuestos acetilados son menos carcinogénicos, los sujetos acetiladores rápidos serán menos sensibles a la exposición al humo del tabaco [20,31].

La cistitis causada por *Schistosoma haematobium* se relaciona con la aparición de carcinoma epidermoide de vejiga. En Egipto y otras regiones donde este parásito es endémico, el carcinoma epidermoide de la vejiga urinaria supone uno de los tumores más frecuentes de este órgano [32]. En nuestro medio la esquistosomiasis es una enfermedad excepcional, aunque con los flujos migratorios en ascenso desde países endémicos es de esperar un aumento progresivo de su incidencia. Por otro lado, siguiendo un mecanismo patogénico similar, la infección de orina crónica, la sonda permanente y la litiasis vesical pueden producir también cambios metaplásicos vesicales y una mayor incidencia de carcinoma escamoso de la vejiga urinaria. Varios trabajos han demostrado la presencia de algunos serotipos de papilomavirus humano (VPH) en el cáncer de vejiga urinaria, aunque con resultados muy dispares [33,34]. A día de hoy no se conoce bien el mecanismo patogénico de la carcinogénesis asociada a esta infección vírica, aunque se asume que podría estar relacionada con la incorporación de material

génico vírico a las células huésped, puesto que se han detectado oncogenes formando parte del genoma viral.

Son muchos los agentes causales de cáncer vesical a los que podemos exponernos en un contexto de hábitos o de dieta. Entre ellos destaca el consumo abusivo de analgésicos y edulcorantes artificiales [35]. Por otro lado, pacientes tratados con ciclofosfamida, un potente quimioterápico para el tratamiento de neoplasias hematológicas, presentan un riesgo elevado de padecer cistitis hemorrágica y cáncer de vejiga [36]. Se cree que un metabolito de la ciclofosfamida, la acroleína, es el factor responsable tanto del desarrollo de estos tumores como de cistitis hemorrágica [37]. El periodo de latencia del cáncer vesical asociado a ciclofosfamida es relativamente corto, aproximadamente 10 años [38]. También la radioterapia pélvica previa aumenta el riesgo de sufrir cáncer de vejiga [39].

## 1.2 HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE VEJIGA

Uno de los rasgos más destacables del carcinoma de la vejiga urinaria es el gran valor predictivo de los hallazgos anatomopatológicos en el tumor primario tienen sobre la evolución de la enfermedad. Un grupo de tumores, denominados colectivamente cánceres no músculo-invasivos de vejiga, se caracteriza por un curso clínico recidivante y por la escasa frecuencia de producir metástasis en ganglios regionales.

En contraste, un segundo grupo de tumores que puede aparecer de novo o, más frecuentemente, como progresión de un cáncer no músculo-invasivo previo tiene un comportamiento biológico diferente, con frecuente diseminación ganglionar y posterior aparición de metástasis a distancia, estos tumores se denominan cánceres músculo-invasivos. La frecuencia de metástasis ganglionares y la supervivencia a largo plazo tras el tratamiento local agresivo (generalmente cistectomía radical) varían de acuerdo con las características del tumor primario

(categoría T). Ahora bien, más de la mitad de los pacientes tratados exclusivamente con cistectomía radical recidivan y fallecen en los primeros años de seguimiento.

La supervivencia a 5 años de los pacientes con afectación ganglionar es menor del 20 % [40]. Este hecho sugiere que la mayoría de los pacientes con cáncer infiltrante de vejiga presentan ya en el momento del diagnóstico micrometástasis ocultas. Esta es una razón para diseñar estrategias de tratamiento multidisciplinario incluyendo tratamiento sistémico precoz.

### 1.2.1. FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

El cáncer vesical puede aparecer en cualquier parte del urotelio, lo que se conoce como origen multicéntrico, y en cualquier momento en la evolución de la enfermedad; incluso años más tarde del primer diagnóstico [41,42]. Ahora bien, estudios de genética molecular apoyan la teoría de la implantación monoclonal múltiple, aunque existe un sesgo en la mayoría de estos estudios porque se realizan solo con tumores de alto grado [43-45]. Se han evidenciado cambios genéticos y epigenéticos en todo el urotelio de pacientes con tumores vesicales, hallazgos que no son congruentes en todos los casos con la teoría de la migración e implantación que predecirían un aumento de estos cambios solo en las cercanías del tumor primario [46,47].

La mayoría de los cánceres vesicales (75-85%) son no músculo-invasivos en el momento del diagnóstico; es decir, debutan como lesiones que no invaden la lámina propia o que la invaden precozmente sin llegar a infiltrar la *muscularis propria*. Sólo el 15-25% de las lesiones se diagnostican como enfermedad que infiltra esta estructura o más en profundidad [12,48,49]. En términos generales, en la población de lesiones superficiales se observa una tasa de recurrencia del 50-80% y un 10-25% de progresión a enfermedad músculo-invasiva. Se han descrito recurrencias tardías, incluso después de un periodo mayor de 5 años, no solo

para los tumores de alto grado sino también para las neoplasias papilares bien diferenciadas [41,49-51]. Ahora bien, la mayoría de estas recurrencias suelen ser carcinomas no músculo-invasivos de bajo grado. Por otro lado, el 50% de los tumores que invaden el músculo tienen riesgo de presentar metástasis a distancia en el momento diagnóstico, en ocasiones clínicamente inadvertidas [50].

### 1.2.2. LA PREDICCIÓN DE PRONÓSTICO EN EL CÁNCER VESICAL

El espectro clínico del cáncer vesical incluye lesiones variadas que van desde tumores superficiales hasta metastásico, pasando por tumores musculo-invasivos. Cada una de estas lesiones presenta su comportamiento clínico diferente, lo que implica distintas necesidades terapéuticas. Se admite que el factor pronóstico más importante en términos de supervivencia en pacientes con cáncer vesical es el estadio patológico. Las tasa de supervivencia a los 5 años en los tumores T2 a T4 ronda entre 60-80% y 0-18%, respectivamente.

Estas diferencias vienen de alguna forma determinadas por el riesgo variable de afectación ganglionar. De hecho, en series contemporáneas se han publicado supervivencias de hasta 57% a los 5 años para pacientes con enfermedad pN1, en comparación con 0-27% para pacientes con categorías patológicas N2-3 [52-56].

Sin duda alguna la presencia de invasión vascular y linfática es el principal factor pronóstico independiente que predice supervivencia y la aparición de implantes metastásicos. Los órganos que más frecuentemente presentan metástasis de carcinoma urotelial son: hígado (38%), pulmón (36%), hueso (27%), suprarrenales (27%) e intestino (13%), aunque prácticamente cualquier otro órgano puede verse comprometido [57,58]. La presencia de metástasis a distancia es un factor ominoso ya que a pesar del tratamiento con quimioterapia sistémica, la tasa de supervivencia a los 5 años es prácticamente nula [59].

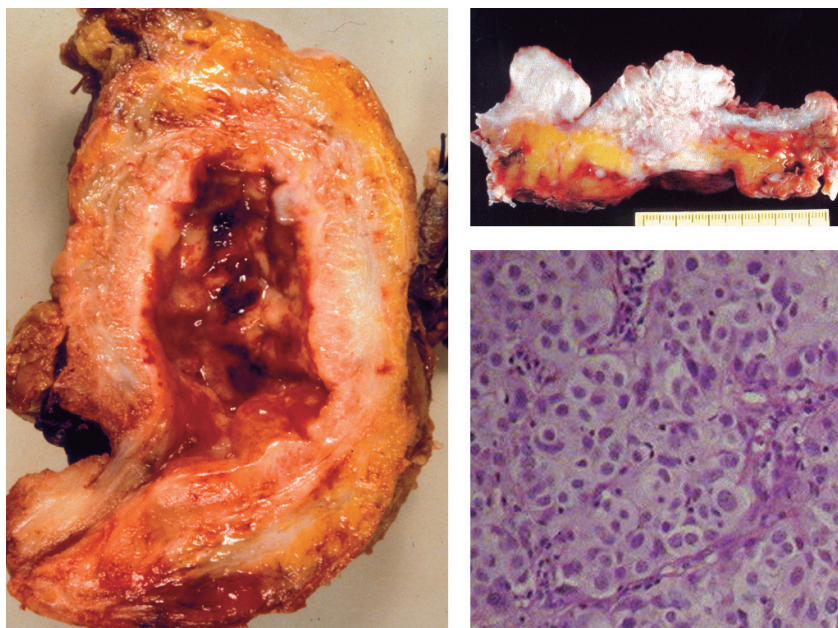
Aproximadamente un 5% de los pacientes con tumores papilares bien diferenciados presentarán diseminación vascular o linfática, pero esta cifra aumenta hasta 20-50% en el caso de los tumores de alto grado [60,61]. La diseminación linfática es independiente y puede presentarse incluso con anterioridad a la diseminación vascular.

La presencia de células tumorales en ganglios linfáticos esta estrechamente ligada a la categoría T y al grado tumoral, aunque se han descrito implantes ganglionares incluso en tumores no músculo invasivos. Wiesner et al. realizaron cistectomía y linfadenectomía pélvica en 219 pacientes con cáncer superficial y objetivaron metástasis ganglionares hasta en un 15% de los pacientes con tumores no músculo invasivos de alto grado [62].

### 1.2.3. LA TERAPÉUTICA DEL CÁNCER VESICAL

La cistectomía radical es el tratamiento de elección del cáncer vesical músculo-invasivo, en pacientes “aptos” desde el punto de vista médico, teniendo en cuenta edad y comorbilidad. La naturaleza de dicha cirugía, diseñada para proporcionar márgenes limpios y prevenir la recurrencia local ha superado la prueba del tiempo proporcionando tasas de supervivencia duraderas a largo plazo (Figura 2).

No obstante, la cistectomía radical no trata de forma eficiente la enfermedad metastásica; ni siquiera la enfermedad metastásica incipiente, por lo que a pesar de que se complementa con diferentes modalidades de quimioterapia sistémica pre o postoperatoria, el fracaso en el control de la enfermedad es una realidad actualmente insalvable. Este hecho es el principal motivo por el que el cáncer vesical músculo-invasivo presenta pobre supervivencia, a pesar de todos los esfuerzos terapéuticos.



**Figura 2.** Especimen de cistoprostatectomía en fresco (A). Tallado de la pared vesical para la correcta evaluación de la infiltración mural (B). Diagnóstico histológico: carcinoma urotelial de alto grado (C).

No cabe duda de que las mejoras en la técnica quirúrgica, en el manejo anestésico, en los antibióticos y en la selección de los pacientes han reducido las complicaciones mayores y la tasa de mortalidad asociadas al procedimiento [63-66]. Las series contemporáneas de cistectomía describen a 5 años unas tasas de supervivencia para pT2 y pT3-pT4 con ganglios negativos de 67% a 84% y de 32% a 58%, respectivamente [67-69]. Teniendo en cuenta las importantes implicaciones de la linfadenectomía, los datos del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, con ganglios claramente positivos muestran que el 32% y el 10% de los tumores pT2 y pT3 con ganglios en el espécimen de cistectomía sobreviven 10 años [70].

El interés por una mejor calidad de vida a través de las estrategias de preservación vesical ha llevado a emplear radioterapia sola o combinada con

resección transuretral agresiva y quimioterapia (terapia trimodal) para conseguir el control local de la enfermedad. No obstante, se ha puesto en duda el papel curativo de la monoterapia con irradiación [71,72]. Recientemente se han empleado diversas maneras para mejorar los resultados de la radioterapia, que incluyen fraccionamiento acelerado, hiperfraccionamiento, y quimio-radiosensibilización concurrente. Stuschke et al. analizaron dos ensayos aleatorizados y mostraron que, en comparación con el fraccionamiento convencional, el hiperfraccionamiento redujo significativamente la probabilidad de muerte y el fracaso en obtener una respuesta completa en tumores T2 y T3 [73]. Horwich et al. demostraron respuestas completas en el 81% de 70 pacientes que habían sido tratados con fraccionamiento acelerado [74]. No obstante, no se han llevado a cabo ensayos clínicos aleatorizados entre radioterapia y cirugía.

Otros estudios recientes han investigado la adición de un agente sensibilizador a la radiación con intención de mejorar la supervivencia de la radioterapia externa. De hecho, más de la mitad de los pacientes presentan metástasis clínicas a pesar del tratamiento loco-regional por lo que se han empleado diversas pautas de quimioterapia: antes de la cistectomía (neoadyuvante), peroperatoria e inmediatamente después de cistectomía o radioterapia (adyuvante), y como modalidad combinada en protocolos de preservación vesical con o sin radioterapia o resección transuretral agresiva. Los resultados sobre la eficacia de la quimioterapia adyuvante después de cistectomía son actualmente controvertidos, debido a errores metodológicos en los ensayos clínicos y a la interrupción prematura de los mismos al no alcanzar suficiente tamaño muestral, pero parece tener un beneficio en tumores pT3 y pN+, si se administra en los primeros 90 días postoperatorios. La quimioterapia neoadyuvante proporciona un beneficio en supervivencia global de 5-8%, según metanálisis. La resección transuretral suele anticipar o seguirse de otras formas de tratamiento. Hall y Roberts señalaron una supervivencia libre de enfermedad a 3 años en el 65-79% de los pacientes tratados con resección transuretral seguida de metotrexate solo o en combinación con cisplatino [75].



Algunos artículos han demostrado que en casos altamente seleccionados puede conseguirse supervivencias aceptables y similares a la cistectomía radical, empleando la resección transuretral como modalidad terapéutica única [76-77].

### **I.3 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER VESICAL**

Mediante el empleo de la historia clínica el urólogo debe investigar la presencia de factores de riesgo establecido en la anamnesis, como el hábito tabáquico, la exposición ocupacional, abuso de analgésicos, radiación, ciclofosfamida y cistitis crónica [7]. La hematuria intermitente macroscópica indolora es con diferencia el síntoma más común. Además, algunos pacientes refieren tenesmo vesical, disuria, polaquiuria y dolor pélvico. En los tumores más avanzados aparece dolor pélvico y todos los síntomas relacionados con una obstrucción de las vías urinarias.

La exploración física debe incluir una palpación bimanual del recto y la vagina. En los pacientes con tumores localmente avanzados puede identificarse una masa pélvica palpable. Además, ha de realizarse una exploración bajo anestesia antes y después de la RTU para valorar si existe una masa palpable o si el tumor se encuentra fijado a la pared de la pelvis. La exploración física rara vez revela algún hallazgo en los tumores superficiales, por lo que se necesita un elevado índice de sospecha en el momento de investigar la presencia de esta entidad. La citología urinaria puede ser de gran utilidad a la hora de evaluar de forma no invasiva la presencia de tumor vesical y adquiere mayor importancia si se combina su valor con el uso de ecografía, sobre todo en el diagnóstico inicial, o de cistoscopia, especialmente en el seguimiento de los pacientes. Desde que fuese descrita en 1945 por Papanicolau y Marshall [78], la citología de orina ha sido el principal elemento para el diagnóstico y seguimiento del carcinoma de células transicionales vesical. Una citología urinaria positiva puede indicar la presencia de un tumor urotelial en algún lugar de las vías urinarias,

desde el cáliz hasta la vejiga y la porción proximal de la uretra, pasando por los uréteres. Una citología de orina positiva es un dato altamente predictivo de la presencia de cáncer transicional vesical, con sensibilidad en torno al 40-60%; incluso en presencia de cistoscopia normal [79,80]. El valor de la citología aumenta considerablemente cuando se trata de lesiones de alto grado, en las que la sensibilidad llega al 80-90% y la especificidad al 95-98% [81]. Como norma general, debe evitarse el estudio de especímenes de micción matutina que aportan elevada degeneración celular debida a los largos periodos de acúmulo de la orina. La citología está justificada rutinariamente desde el punto de vista de coste-eficiencia solo en la evaluación de poblaciones de alto riesgo [82,83].

El diagnóstico del cáncer de vejiga depende básicamente de la exploración cistoscópica de la vejiga y del examen histológico del tejido resecado. Por lo general, la cistoscopia se efectúa en un principio en el consultorio, con instrumentos flexibles. Cuando en los estudios de imagen iniciales (ecografía, tomografía computarizada o resonancia magnética) se ha observado un tumor vesical sin lugar a dudas, puede omitirse la cistoscopia diagnóstica porque el paciente se someterá a una RTU para obtener un diagnóstico histológico. Se requiere una descripción meticulosa de los hallazgos, que ha de incluir la consignación del lugar, tamaño, número y aspecto (papilar o sólido) de los tumores, así como una descripción de las alteraciones de la mucosa, por lo que se considera recomendable emplear un diagrama vesical.

El diagnóstico histológico de la neoplasia vesical se realiza tras la resección transuretral de la misma (RTU). El objetivo de la RTU es permitir un diagnóstico y una evaluación correcta por parte del anatomopatólogo, lo que supone la inclusión de músculo vesical en las biopsias por resección de tamaño suficiente.

La modalidad de resección depende del tamaño de la lesión. Los tumores pequeños (menores de 1 cm) pueden resecarse en bloque; en este caso, la pieza contiene el tumor completo más una parte de la pared de la vejiga subyacente,

incluido músculo vesical. Los tumores grandes tienen que resecarse por separado en fracciones, que comprenden la parte exofítica del tumor, la pared de la vejiga subyacente con el músculo detrusor y los bordes de la zona de resección. Hay que enviar al anatomopatólogo las piezas de las distintas fracciones en recipientes independientes para que pueda hacer un diagnóstico correcto. En la medida de lo posible, ha de evitarse la cauterización durante la resección para evitar la destrucción del tejido.

Los tumores vesicales suelen ser multifocales. Además, los tumores se pueden acompañar de carcinoma *in situ* (Cis), por definición carcinoma intraepitelial plano de alto grado, o de diferentes grados de displasia urotelial asociada. Estas lesiones pueden manifestarse como zonas enrojecidas aterciopeladas indistinguibles de inflamación o no verse en absoluto. Cuando la mucosa es de aspecto normal el Cis puede diagnosticarse también mediante biopsia múltiple aleatoria o mediante biopsia dirigida a zonas fluorescentes en el diagnóstico fotodinámico (DFD). La cistoscopia de fluorescencia se lleva a cabo con luz azul filtrada tras la instilación intravesical de un fotosensibilizante, habitualmente ácido aminolevulínico (5-ALA) o hexaminolevulinato (HAL). Se ha confirmado que la biopsia y la resección guiadas por fluorescencia son más sensibles que los procedimientos convencionales para detectar tumores malignos, sobre todo Cis [84-86]. Sin embargo, la inflamación, una RTU reciente o la instilación intravesical pueden producir resultados falsamente positivos. El material obtenido con biopsias aleatorias o dirigidas debe enviarse para examen anatomopatológico en recipientes independientes.

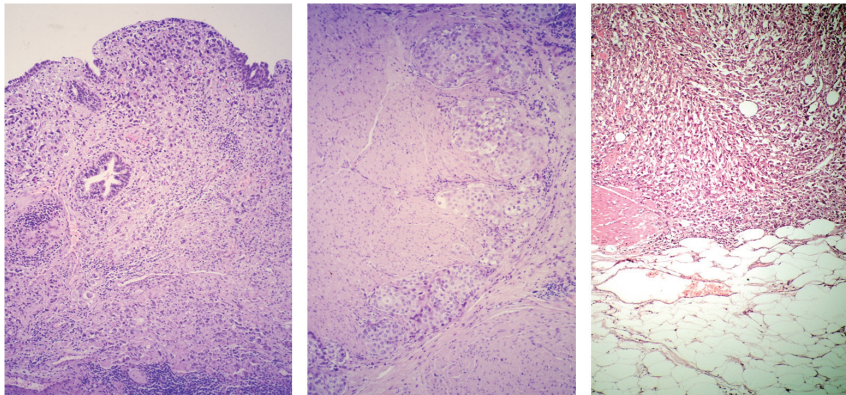
Se ha descrito afectación de la uretra y los conductos prostáticos en varones con tumores vesicales. Aunque se desconoce el riesgo exacto, parece ser mayor cuando el tumor está localizado en el trigono o el cuello de la vejiga, en presencia de Cis de vejiga y en caso de tumores múltiples [87,88]. En estos casos y cuando la citología es positiva o se ven alteraciones de la uretra prostática, se recomiendan biopsias de esta zona. La biopsia se obtiene con un asa de resección a partir del área precolicular. Ha de tenerse especial precaución con los tumores

localizados en el cuello de la vejiga y el trigono en mujeres en las que se prevé la conservación de la uretra en una intervención ulterior de neovejiga ortotópica. Las biopsias preoperatorias del cuello de la vejiga son aconsejables, pero no obligatorias, siempre que se obtengan cortes congelados del borde de la uretra en el momento de la intervención quirúrgica.

Tras la RTU inicial hay un riesgo notable de presentar tumor residual [89,90]. En el 33-53 % de los pacientes se observa enfermedad persistente [90,91]. Además, es posible que la resección inicial clasifique el tumor por debajo de su estadio real. La estadificación correcta es extremadamente importante porque influirá directamente en la modalidad de tratamiento. Siempre se debe efectuar una segunda RTU cuando la primera haya sido incompleta, por ejemplo, cuando hay tumores múltiples o grandes o cuando el anatomopatólogo indica que la muestra no contenía tejido muscular. Además, se debe practicar una segunda RTU cuando en la inicial se detecte un tumor sin invasión muscular de alto grado. No hay unanimidad con respecto a la estrategia y el momento de la segunda RTU. La mayoría de los autores recomiendan la resección al cabo de 2-6 semanas de la RTU inicial. El procedimiento debe incluir la resección del foco tumoral primario.

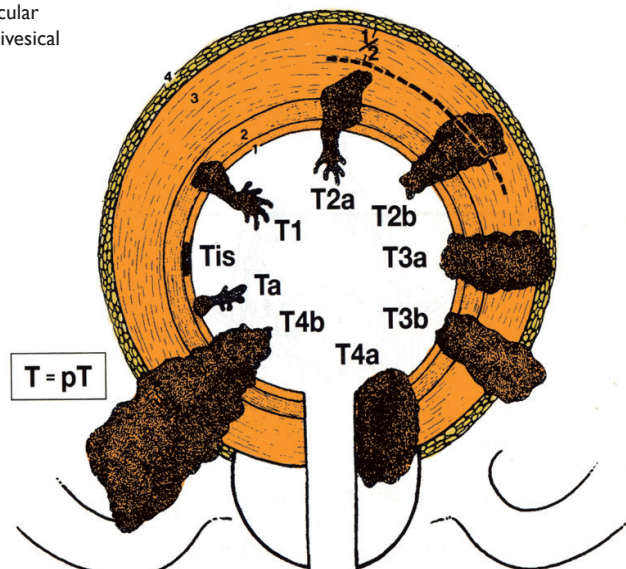
### 1.3.1. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER VESICAL

Hace escasas décadas, Hugh Jewett evaluó la supervivencia de los pacientes a quienes se les extirpó la vejiga por padecer cáncer vesical y descubrió que la profundidad de la invasión en la pared vesical fue el factor determinante más importante para la supervivencia de estos pacientes. En 1944, Jewett y Strong llevaron a cabo la primera clasificación formal para la estadificación de los pacientes con cáncer de vejiga. Dividieron a los pacientes en tres grupos (A, B y C), que identificaban respectivamente a los pacientes con afectación submucosa, muscular y perivesical (Figura 3), respectivamente [92].



**Figura 3.** Marcas histológicas que sirven de base para la clasificación de la enfermedad. (A) Neoplasia vesical con invasión del tejido conectivo subepitelial (T1). (B) Neoplasia vesical con invasión de la muscular propia (T2). (C) Neoplasia vesical con afectación de la grasa perivesical (T3).

1. Epitelio
2. Tejido conjuntivo subepitelial
3. Capa muscular
4. Grasa perivesical



**Figura 4.** Clasificación TNM que muestra diagrama de clasificación T.

**TABLA II.** Clasificación TNM para el cáncer de vejiga de la *American Joint Committee on Cancer / Union Internationale in Contre le Cancer (AJCC/UICC).*

<b>CATEGORÍA T:</b> Tumor primario.	• No puede evaluarse (Tx)
	• Sin evidencia de tumor (T0)
	• Carcinoma papilar no invasor (Ta)
	• Carcinoma in situ (Tis)
	• Tumor que invade tejido conectivo subepitelial (T1)
	• Tumor que invade músculo superficial (mitad interna) (T2a)
	• Tumor que invade músculo profundo (mitad externa) (T2b)
	• Tumor que invade grasa perivesical (microscópicamente) (T3a)
	• Tumor que invade grasa perivesical (macroscópicamente) (T3b)
	• Tumor que infiltra próstata, vagina o útero (T4)
<b>CATEGORÍA N:</b> Ganglios linfáticos regionales	• No puede evaluarse (Nx)
	• Metástasis en un único ganglio $\leq 2$ cm (N1)
	• Metástasis en un ganglio 2-5 cm o ganglios múltiples (N2)
	• Metástasis gangliolares $\geq 5$ cm (N3)
<b>CATEGORÍA M:</b> Metástasis a distancia	• No puede evaluarse (Mx)
	• Sin metástasis (M0)
	• Metástasis a distancia (M1)

A finales de los años 40 estas descripciones constituyeron la base para la clasificación TNM de los tumores de la vejiga urinaria. Actualmente se emplea la edición de 2009 de la clasificación TNM de la *American Joint Committee / Union Internationale Contre le Cancer (TNM)* (TABLA II, Figura 4) [93]. Se trata de una mezcla mejorada que ha nacido tanto de la clasificación de Jewett-Marshall como de la TNM clásica. Este sistema se basa en la evaluación de tres componentes: T.- extensión del tumor primario, N.- presencia o ausencia de enfermedad ganglionar

regional, y M.- presencia o ausencia de metástasis a distancia. Las numeraciones de dichas categorías pueden agruparse posteriormente en estadios, que intentan estandarizar la investigación clínica. Se describen así dos clasificaciones: 1.-clínica (pretratamiento) y 2.-patológica (post-quirúrgica o histopatológica). La diversidad de las opciones de tratamiento quirúrgico depende del estadio y se basa en el correcto entendimiento de la extensión de la enfermedad. La infraestadificación clínica somete al individuo a terapias subóptimas, y la sobre-estadificación puede conllevar un grado no deseable de morbilidad relacionada con el tratamiento.

En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad internacional de patología urológica (*International Society of Urological Pathology*, ISUP) propusieron una nueva clasificación de los tumores uroteliales no invasores. Fue publicada por la OMS en 2004 [94,95]. Su principal contribución es una descripción histológica detallada de los diversos grados, aplicando criterios citológicos y estructurales específicos. El consenso de la OMS alcanzado en 1973 clasificaba las lesiones en 3 grados histológicos, desde más (G1) a menos (G3) diferenciado. La actual graduación de la OMS de 2004, diferencia entre papiloma, neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno (NUPBPM) y carcinoma urotelial de bajo y alto grado. El papiloma está compuesto por un núcleo fibrovascular delicado recubierto de urotelio normal. Una NUPBPM se define como un tumor fibrovascular papilar recubierto de urotelio proliferado que supera el espesor normal. Aunque las NUPBPM presentan un riesgo insignificante de progresión, no son completamente benignas y tienen tendencia a recidivar. El grupo del carcinoma urotelial papilar de bajo grado comprende todos los casos anteriores de grado I (OMS 1973) y algunos casos anteriores de grado 2 (en caso de existir una variación de las características estructurales y citológicas con un aumento alto).

Se recomienda utilizar la clasificación de la OMS de 2004, ya que ello se traduciría en un diagnóstico uniforme de los tumores, que se clasifican mejor según su riesgo potencial. Sin embargo, hasta que dicha clasificación no se haya validado en más estudios clínicos, hay que graduar los tumores mediante las clasificaciones

de la OMS de 1973 y 2004 [96]. En la mayor parte de los ensayos clínicos publicados hasta la fecha sobre tumores vesicales se ha empleado la clasificación de la OMS de 1973. En el cáncer de vejiga invasor no suele haber casos de NUPBPM o carcinoma de bajo grado. Todos los casos son carcinomas uroteliales de alto grado (grado 2 ó 3 en la clasificación de la OMS de 1973). Por este motivo, no puede facilitarse más información pronóstica mediante la graduación del cáncer de vejiga con invasión muscular. Sin embargo, algunos subtipos morfológicos son importantes para facilitar el pronóstico y las decisiones terapéuticas: carcinoma microcítico o de célula pequeña, carcinomas uroteliales con diferenciación epidermoide o glandular parcial, carcinoma urotelial con diferenciación trofoblástica, carcinoma urotelial micropapilar, y carcinoma anidado, principalmente. A efectos de estadificación, se recomienda la clasificación TNM de 2002/2009. El patrón de invasión muscular puede aportar cierta información pronóstica. La mayoría de los casos presentan crecimiento nodular o cordonal, si bien en torno al 44 % muestra un patrón infiltrante. La invasión de los vasos sanguíneos y la infiltración ganglionar tienen una importancia pronóstica independiente. Parece que la categoría pN guarda una relación estrecha con el número de ganglios linfáticos estudiados por el anatomopatólogo. Por este motivo, algunos autores han señalado que deben investigarse más de diez ganglios linfáticos para asignar correctamente un pN0 [97]. Se están estudiando nuevos marcadores pronósticos. En la actualidad, no existen pruebas suficientes para recomendar el uso sistemático del marcador pronóstico p53 en la enfermedad con invasión muscular de alto riesgo, ya que no aporta datos suficientes en los que fundamentar el tratamiento de un paciente concreto.

### 1.3.2. CÁNCER VESICAL Y MÉTODOS DE IMAGEN

Disponemos de diferentes métodos de imagen para la estadificación de los tumores de vejiga entre los que se incluyen la ecografía, urografía intravenosa, TC y RM [98]. El objetivo fundamental, a alcanzar mediante los métodos de imagen, es la correcta estadificación local y a distancia de los tumores, para poder



realizar una correcta planificación del tratamiento y para poder determinar su pronóstico. La sensibilidad de la ecografía transabdominal en la detección de los tumores de vejiga es muy alta, algunos trabajos publicados en la literatura indican una sensibilidad de hasta un 98% en comparación con la urografía intravenosa que es de un 54%, de ahí que en algunos centros se haya abandonando la urografía intravenosa como método de imagen para la detección de masas vesicales [99]. La ecografía transabdominal puede demostrar tumores papilares de entre 2 y 3mm, la sensibilidad es menor en los tumores planos y localizados en el techo vesical. En general con la ecografía se tiende a sobreestimar los tumores superficiales con una mayor fiabilidad para la estadificación local de los tumores en estadios más avanzados. Entre sus principales ventajas se incluyen la ausencia de morbilidad, no requiere preparación intestinal, bajo coste, el poder realizarla en pacientes con insuficiencia renal y su gran sensibilidad, sobre todo en tumores mayores de 5 mm (80%). Una de las limitaciones de la ecografía es la detección de adenopatías que no pueden ser demostradas mediante esta técnica [100]. La urografía intravenosa (UIV) se utiliza principalmente para detectar defectos de llenado en los cálices, la pelvis renal y los uréteres, así como hidronefrosis, lo que puede indicar la presencia de un tumor ureteral. La UIV también puede detectar tumores grandes, que se pueden ver como defectos de llenado en la vejiga. Actualmente se pone en duda la necesidad de practicar una UIV sistemática una vez que se detecta un tumor vesical por la baja incidencia de hallazgos importantes obtenidos con este método. La incidencia de CCTUS es baja (1,8 %), pero aumenta al 7,5 % en el caso de los tumores localizados en el triángulo [101].

La tomografía computerizada (TC) es una técnica no invasiva que proporciona un excelente contraste entre la pared de la vejiga y la grasa extraperitoneal, aporta información sobre el grado de invasión local del tumor; permite además evaluar la presencia de adenopatías, y la extensión a otros órganos de la enfermedad, así como la presencia de tumores del tracto urinario superior y complicaciones como hidronefrosis. La mayoría de los tumores de vejiga se visualizan en los estudios de TC, existiendo ciertas limitaciones para valorar tumores de la base o el techo de

la vejiga. Actualmente con las reconstrucciones multiplanares de alta resolución que pueden realizar los equipos helicoidales de TC se ha conseguido aumentar la sensibilidad para la detección de los tumores en estas localizaciones, corrigiendo en parte la limitación del TC frente a la resonancia magnética (RM). A pesar de ello, la TC no permite diferenciar las capas de la pared de la vejiga por lo que no podemos determinar con esta prueba el grado de invasión de la pared de la vejiga. El papel fundamental de la TC es diferenciar el estadio T3a del estadio T3b o estadios superiores T4a y T4b. En el estadio T3a únicamente hay un engrosamiento de la pared de la vejiga, en el estadio T3b el contorno vesical es irregular y la grasa perivesical adyacente al tumor presenta altos valores de atenuación [100]. En el estadio T4a existe invasión de las vesículas seminales y en el estadio T4b la afectación se extiende al músculo obturador interno.

La fiabilidad de la TC en la estadificación de los tumores de vejiga varía entre el 64% y el 92% y para la evaluación de adenopatías entre el 75% y el 92% según los estudios [102,103]. En general la TC tiende a sobreestimar el estadio tumoral debido a la fibrosis perivesical que se produce tras la RTU, porque se realiza tras la intervención quirúrgica una vez conocida la histología. Se admite por este motivo, que un intervalo de al menos 1 semana después de la RTU reduce el número de falsos positivos asociados a los cambios inflamatorios postquirúrgicos. Las guías clínicas de cáncer de vejiga de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomiendan la realización de una TC previo a RTU, si el tumor tiene aspecto sólido en la cistoscopia, es de alto grado citológico o existe sospecha de invasión muscular [104]. En cuanto a las adenopatías la TC tiende a infravalorar su estadio ya que el diagnóstico de malignidad se basa en su tamaño y no se puede demostrar tumor en ganglios de tamaño normal, la fiabilidad varía entre el 50% y el 97%.

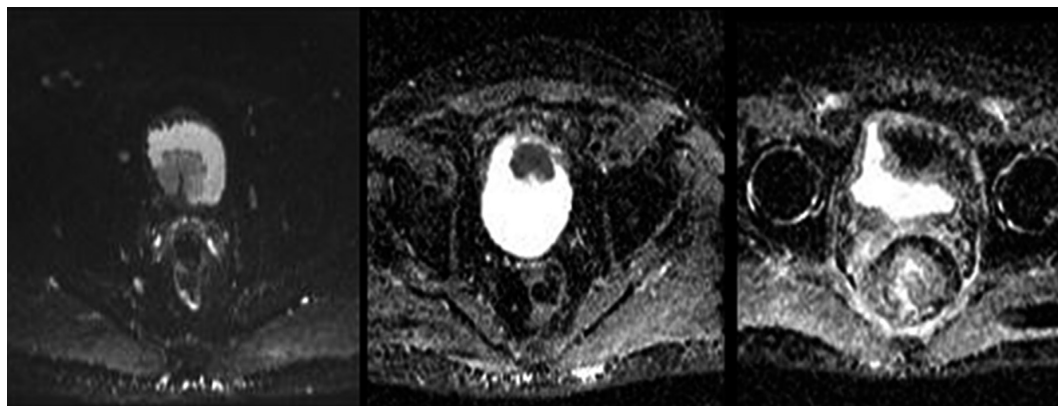
No cabe duda de que la RM está adquiriendo cada vez un papel más importante en la estadificación de los tumores de vejiga [105]. La posibilidad de realizar cortes en todos los planos del espacio y perpendiculares a la pared vesical supone una gran ventaja técnica. Incluso el uso de soporte informático permite llevar a cabo reconstrucciones

de alta definición que posibilita realizar incluso cistoscopia virtual. Otra ventaja de esta modalidad es el gran contraste que existe entre la grasa perivesical, la propia pared y la luz de la vejiga, lo que resulta muy útil para la estadificación tumoral [106].

Diversos artículos han demostrado la superioridad de la RM frente a la TC en la estadificación local del carcinoma de vejiga. La fiabilidad de la TC varía entre un 65% y un 85% mientras que la fiabilidad de la RM está entre un 73% y un 96% [98]. La RM proporciona un mayor contraste entre los tejidos permitiendo una mejor diferenciación entre los estadios T1 y T2 de los estadios T3a y T3b. Debido a su capacidad multiplanar consigue a su vez una mejor visualización del techo y la base de la vejiga así como del trigono, próstata, vesículas seminales y una mejor demostración de la afectación en los estadios T4a y T4b. Las secuencias potenciadas en T1 son muy útiles para valorar la extensión a la grasa perivesical, para la identificación de adenopatías y para la evaluación metástasis óseas. Las secuencias potenciadas en T2 proporcionan un gran contraste entre la orina y la pared vesical y son muy útiles para demostrar la invasión de la pared vesical y de los órganos vecinos [107-112]. Las secuencias dinámicas con gadolinio intravenoso demuestran el realce de la mucosa y permiten diferenciar esta de las capas musculares mejorando de esta manera la fiabilidad en la estadificación local de los tumores [113,114].

En las secuencias potenciadas en T1 los tumores presentan una mayor intensidad de señal que la orina, menor que la grasa perivesical y son isointensos en relación a la propia pared vesical. En las secuencias potenciadas en T2 la pared normal de la vejiga aparece hipointensa en relación a la orina y la mayoría de los tumores son hiperintensos en relación a la pared vesical. Si en las secuencias potenciadas en T2 visualizamos la pared vesical con normalidad el tumor debe clasificarse como Tis, Ta, T1 o T2, si por el contrario la pared vesical está interrumpida el tumor debe clasificarse como T3a o superior. Podemos decir que la utilización de gadolinio intravenoso mejora la fiabilidad de la estadificación local en un 9%-14% [115-118]. Las secuencias de difusión de imagen son capaces de detectar el 98-100% de los

tumores de vejiga, permiten valorar cualitativamente y cuantitativamente el coeficiente de difusión aparente (mapa ADC), y aportan información morfológica y funcional de la lesión, pudiendo caracterizar no solo la extensión de la enfermedad sino incluso también la agresividad histológica y el grado de diferenciación de la lesión [105] (Figura 5).



**Figura 5.** Hallazgos en RM sugestivos de neoplasia vesical: (A) Imagen en T2 con signo “del gusano” característico de lesiones no invasivas; (B) Estudio de difusión (MRI-DW) con afectación de capa muscular; (B) MRI-DW con afectación de grasa perivesical.

La mayoría de los pacientes con tumores vesicales son estudiados mediante TC o RM tras la realización de la biopsia. La diferenciación entre cambios secundarios a la biopsia en la pared vesical y tumor se hace muy difícil, en los estudios dinámicos con gadolinio se ha visto que en general el tejido tumoral presenta un realce precoz a diferencia de la fibrosis cicatricial secundaria a la biopsia, en algunos trabajos se publica una fiabilidad para diferenciar la cicatriz de tumor entre un 80% y un 90%, pero no siempre resulta fiable [107,119,120]. En 2006 se estableció un vínculo entre medios de contraste a base de gadolinio y la fibrosis sistémica nefrogénica (FSN) que puede causar una fibrosis sistémica debilitante o mortal. Se acepta de forma generalizada que los pacientes con una función renal disminuida ( $FG < 60$  ml/min) o muy disminuida ( $FG < 30$  ml/min) tienen riesgo de presentar FSN y en ellos debe evitarse el uso de gadolinio. Además la RM tiene sus limitaciones incluso empleando secuencias dinámicas con gadolinio, la diferenciación entre edema y

tumor puede ser difícil y tiende a sobreestimar el estadio tumoral local. La detección de adenopatías metastásicas tiene grandes implicaciones en cuanto al pronóstico de estos pacientes. Los pacientes con adenopatías metastásicas tienen un peor pronóstico y la mayoría no se benefician de una cistectomía radical. La incidencia de adenopatías es superior en los estadios T3 y T4. Si existe infiltración profunda de la capa muscular la incidencia aumenta entre un 20% y un 80%. Si hay invasión extravesical entre un 50% y un 60% de estos pacientes presentarán afectación ganglionar en el momento del diagnóstico. La fiabilidad para la detección de adenopatías metastásicas en RM varía entre el 73% y el 98% [121]. En los estudios de RM empleamos como criterio de malignidad el tamaño de las adenopatías al igual que la TC, los ganglios en pelvis se consideran patológicos cuando son superiores a 1 cm. Actualmente, en la mayoría de los centros se emplea la TC por su mayor disponibilidad y menor coste, aunque la RM está adquiriendo un papel cada vez más relevante en el estudio de estos pacientes, pues diversos trabajos avalan su superioridad frente a la TC en la estadificación de los tumores vesicales.

Antes de cualquier tratamiento con intención curativa resulta esencial determinar la presencia de metástasis a distancia. La TC y la RM son los instrumentos diagnósticos de elección para detectar metástasis en los pulmones y el hígado. Las metástasis óseas o cerebrales en el momento de presentación de un cáncer de vejiga invasor son raras, por lo que la gammagrafía ósea y otros estudios de imagen cerebral no se encuentran indicados sistemáticamente, a menos que el paciente manifieste síntomas o signos concretos indicativos de metástasis óseas o cerebrales [122,123]. La RM es más sensible y específica para diagnosticar metástasis óseas que la gammagrafía ósea [124,125].

La utilidad del PET-TAC para estadificación local del cáncer de vejiga invasor es similar a la TC, mientras que su utilidad es superior en la evaluación de afectación ganglionar, con una sensibilidad de 57-81% y una especificidad de 88-100% [126]. La  $^{18}\text{F}$ -fluordesoxiglucosa (FDG), es el trazador más utilizado en el diagnóstico del cáncer de vejiga, aunque su eliminación urinaria puede conferir

errores en el diagnóstico, debido a la acumulación de FDG, que simula captación por el tumor, o bien ocultar una lesión tumoral focal. Se han descrito protocolos para disminuir significativamente la actividad vesical de FDG y mejorar, por tanto, la calidad de imagen. La TABLA III muestra las diversas herramientas clínicas de las que disponemos para estimar la extensión de la enfermedad.

<b>TABLA III. Herramientas para clasificar el cáncer de vejiga</b>		
<b>Local (T)</b>	<b>Regional (N)</b>	<b>A distancia (M)</b>
EBA (T3b)		
Citología		
Urografía intravenosa	TAC/RNM	Radiografía de tórax
Ecografía	Isótopos	TAC/RNM
Cistoscopia/Biopsia/RTU	Laparoscopia	Gammagrafía ósea
Biopsia de próstata		PET

EBA: Exploración bajo anestesia, TAC: Tomografía axial computarizada, RNM: Resonancia nuclear magnética, RTU: Resección transuretral, PET: Tomografía por emisión de positrones

### I.3.3. EL PROCESO METASTÁSICO EN EL CÁNCER VESICAL

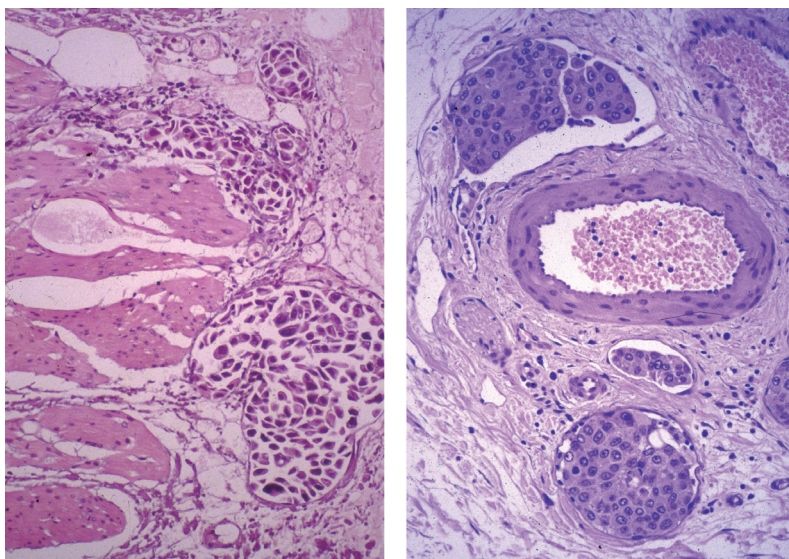
A pesar de la mejora en la detección y tratamiento del cáncer vesical, la mayoría de las muertes por esta enfermedad las producen las metástasis que resisten al tratamiento convencional [127]. El análisis de las tendencias en las tasas de incidencia y mortalidad indican que el empirismo terapéutico del carcinoma urotelial avanzado es poco probable que mejore esta perspectiva. Lo que se necesita para que se desarrollen terapias más efectivas es el conocimiento de las propiedades moleculares y celulares del cáncer vesical y las interacciones entre el tumor y el huésped que influyen en la diseminación de la enfermedad. Este conocimiento proporcionará la base para que se diseñen terapias específicas. Discutiremos los aspectos moleculares de la interacción huésped-tumor y los mecanismos íntimos del proceso metastásico.

Las neoplasias de células transicionales son biológicamente heterogéneas y están formadas por subpoblaciones de células con diferentes potenciales de crecimiento y diferente capacidad metastásica. En cada tumor solo un grupo de células tiene potencial de metastatizar [128]. Una vez que estas células metastatizan, el microambiente del órgano puede influir el resultado final a través de mecanismos homeostáticos que sabemos están influidos por factores de crecimiento, invasión y angiogénesis [129]. El tratamiento de las metástasis debiera dirigirse contra las células tumorales metastásicas y contra los factores homeostáticos que promueven su desarrollo.

El proceso metastásico del cáncer de vejiga es altamente selectivo e implica una serie de pasos cuya regulación solo se comprende en parte. La capacidad de una célula tumoral de invadir la membrana extracelular es un requisito previo a la metástasis, que favorece la circulación hemática o linfática de la célula tumoral. Las células se liberarán del tumor primario, infiltrarán el estroma subyacente y entrarán en la microcirculación (Figura 6). No obstante, para que suceda la metástasis deben integrarse diversos procesos con el establecimiento celular en el nuevo microambiente, principalmente neoangiogénesis, inhibición de apoptosis y aumento de proliferación celular. Todos ellos y la consecuente remodelación de la matriz extracelular se encuentran regulados por MMPs. Durante la invasión, las células tumorales penetran en la membrana basal, moviéndose a través de la matriz extracelular y alcanzando la circulación, bien a través de los vasos linfáticos o la vascularización sanguínea. Este proceso de entrada en el torrente sanguíneo se denomina intravasación. Las células viajan a través del sistema sanguíneo o linfático y se distribuyen pasivamente a los órganos distantes. En algunos sitios seleccionados las células se extravasan de los capilares e invaden el órgano. Estas células serán neutralizadas por el sistema inmune o permanecerán en estado de latencia. Para que un tumor crezca localmente primero debe suceder su vascularización, y para que esto ocurra debe romperse el equilibrio entre factores pro y anti-angiogénicos secretados por el tumor y/o el microambiente. Bajo la influencia



de diversas señales moleculares las células tumorales proliferan formando primero micrometástasis y luego metástasis clínicas.



**Figura 6.** Hallazgos histológicos que sugieren alto riesgo de diseminación metastásica incipiente: (A) Permeación linfática; (B) Embolización vascular.

Todos los organismos multicelulares requieren un sistema circulatorio eficiente que asegure la distribución de oxígeno y de nutrientes, y la excreción de productos metabólicos de desecho. Lo mismo puede decirse para los tumores. Folkman [130] describió por vez primera en 1971 la necesidad que tienen los tumores de desarrollar su propio sistema sanguíneo cuando superan los 2-3 mm<sup>3</sup>. El crecimiento continuo de los tumores primarios y de las metástasis solo será posible si se establecen vasos sanguíneos alrededor y dentro de ellos [131]. Una vez que sucede la neovascularización el crecimiento aumenta y tiene lugar el establecimiento de metástasis. La investigación reciente apoya la idea de que



inhibiendo esta vascularización se restringe el crecimiento tumoral y la formación de metástasis. El proceso de la angiogénesis comienza con la degradación de la membrana basal que rodea los capilares locales y se sigue con la invasión del estroma circundante por células endoteliales bajo la influencia de estímulos angiogénicos. Los vasos tumorales muestran diferencias con los vasos normales. La arquitectura vascular tumoral es más desorganizada e irregular, con áreas de hipoxia relativa y acidosis, y las membranas de las células endoteliales aumentan su permeabilidad. Esto conlleva que los vasos angiogénicos tengan pérdidas que aumentan las señales y el metabolismo de la matriz extracelular [132]. Las células endoteliales angiogénicas presentan variaciones en los marcadores celulares de superficie y en las moléculas de adhesión celular que pueden permitir la selección de dianas para terapia antiangiogénica [133].

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es una glicoproteína de unión a la heparina homodimérica de 34–42-kDa con potente actividad angiogénica, mitogénica y de aumento de la permeabilidad vascular. Al aumentar dicha permeabilidad vascular facilita la entrada de células tumorales en la circulación, lo que constituye un requisito para que metastatizen a lugares distantes [134]. VEGF existe en cuatro formas que difieren en la longitud de aminoácidos y que se unen a dos receptores de membrana, Flt-1 y Flk-1/KDR. VEGF se identificó por primera vez en 1989, cuando se purificó a partir de células pituitarias y se reconoció como un promotor de la migración y proliferación celular [135]. Muchos estudios han revelado que la sobreexpresión de VEGF y de sus receptores se asocia con invasión y metástasis en tumores humanos [136]. Además, la expresión de VEGF aumenta en condiciones de hipoxia, como las que se asocian con el crecimiento rápido de los tumores [137]. En 1993, Brown et al, [138] asociaron por primera vez VEGF con angiogénesis en cáncer vesical y renal. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de ARNm de VEGF en tumores vesicales se modifica bajo la influencia de la regulación hipóxica [139]. La familia del factor fibroblástico de crecimiento (FGF) comprende una serie de sustancias que tienen actividad mitogénica en diversas células.

El factor fibroblástico de crecimiento básico (bFGF) está presente en la orina de casi la mitad de los pacientes con cáncer de vejiga, en comparación con menos del 10% de los pacientes con muestras de orina de control [140]. Allen et al, [141] compararon dos líneas celulares diferentes y hallaron que bFGF se produce por el cáncer vesical infiltrante y no por el tumor superficial, lo que sugiere que bFGF podría actuar de manera autocrina. Además, bFGF indujo fosforilación de protein-tirosinas solamente en líneas celulares invasivas. De esta forma los datos sugieren que el potencial invasor de un cáncer vesical podría regularse por la expresión de tanto bFGF como de sus receptores. bFGF controla en parte el proceso invasivo del cáncer vesical humano mediante la regulación de la producción de MMPs [142]. Además del papel de bFGF en la progresión del cancer vesical, existe evidencia para implicar el aumento de expresión de bFGF en el desarrollo de la resistencia al cisplatino en líneas celulares [143]. En una serie de pacientes tratados con M-VAC neoadyuvante la expresión de bFGF y la densidad de microvasos en el espécimen de cistectomía resultaron factores pronóstico independientes para el desarrollo de recurrencia de la enfermedad [144]. Estos datos proporcionan evidencia de que bFGF es una diana importante en la patogénesis del cáncer vesical metastásico.

#### **1.4. LA REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR**

La metástasis es la fase final de un proceso celular complejo y coordinado. Los cambios genéticos responsables de los trastornos en la regulación del crecimiento llevan a una proliferación incontrolada que puede comenzar la cascada; pero este crecimiento no se convierte en metástasis hasta que un ambiente favorable cuida y da forma a la invasión inicial. Una colonia de células que inicia el proceso de invasión y de metástasis tiene la capacidad de inducir proteínas facilitadoras que actúan a nivel molecular; tanto intra como extracelularmente. El objetivo es conseguir un entorno que favorece la unión de las células tumorales a la matriz extracelular del huésped, la proteólisis por parte del tumor de las barreras del huésped como la membrana basal, el movimiento de las células tumorales y finalmente la formación de colonias de las células tumorales en la diana a distancia [145,146].

Los compartimentos tisulares están separados por matriz extracelular; una combinación de membranas basales y estroma adyacente. Los aspectos basales de las células epiteliales se unen a la membrana basal. Al lado opuesto se sitúa el estroma intersticial que contiene fibroblastos, miofibroblastos y otras células estromales. Existe un equilibrio, incluso en las fases de remodelación de las poblaciones celulares a cada lado. Las células invasoras desobedecen los límites naturales del órgano y atraviesan tejidos extraños. Este proceso comienza con la transición de carcinoma in situ a carcinoma invasor, en el que las células metastásicas penetran la membrana basal del epitelio y acceden al estroma subyacente para interactuar con las células [146,147].

La membrana basal continua es una matriz densa con colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos que normalmente no contiene poros que permitan el paso celular pasivo, por lo que se requiere una invasión celular activa para entrar en el compartimiento estromal. Una vez allí, las células pueden ganar el acceso a linfáticos o a vasos sanguíneos. Barsky et al. subrayaron la asociación entre invasión y defectos en la membrana basal, sugiriendo así que las células invasoras interactúan de manera diferente a las células normales con la membrana basal [147]. El proceso metastásico se establece en tres fases que incluyen unión a la membrana basal, lisis de la misma y locomoción celular. La unión de las células malignas a la superficie de la membrana basal viene mediada por receptores en las células tumorales que reconocen glicoproteínas de la membrana basal como laminina, fibronectina y colágeno tipo IV [148,149]. La lisis de la membrana basal viene facilitada por la producción de proteasas a partir de las células tumorales. Uno de dichos enzimas, la colagenasa tipo IV, fue descubierto por Liotta a finales de los años 70 [150,151]. El movimiento celular que se conoce como locomoción implica que la célula tumoral se impulsa a través de la membrana basal aprovechando la zona de proteólisis de la matriz [152,153].

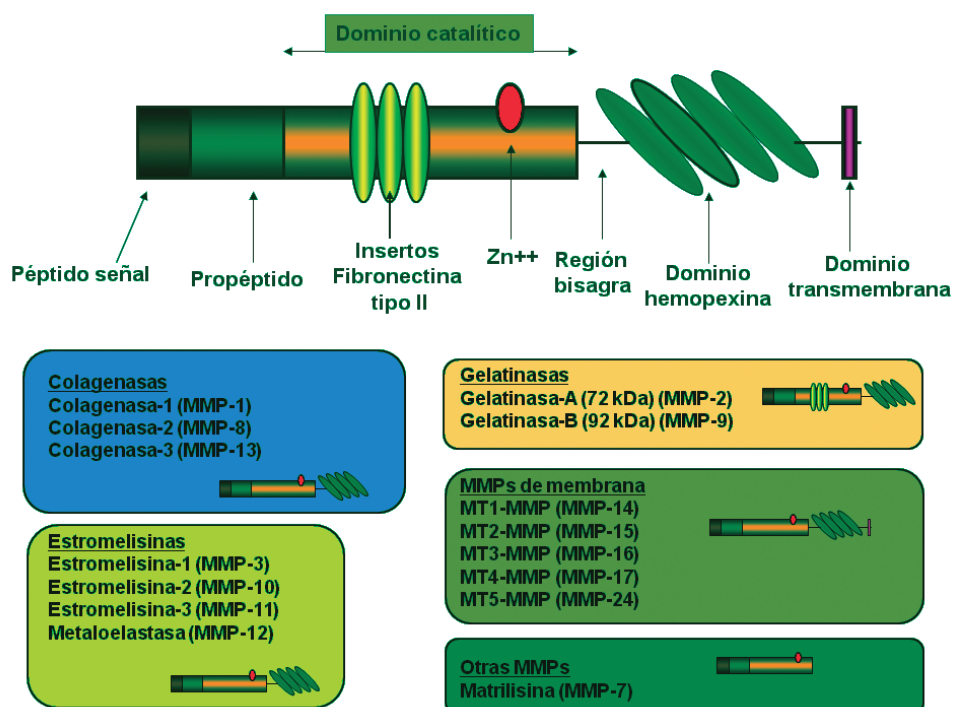
Posiblemente el aspecto más importante de la cascada metastásica sea el proceso de degradación de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas específicos. La proteólisis de las barreras tisulares no es una propiedad única de los procesos malignos. De hecho, se observa durante la implantación en el trofoblasto,

la morfogénesis embrionaria, la remodelación tisular, la invasión bacteriana y la angiogénesis. Pero la diferencia reside en que las células tumorales tienen la habilidad de acoplar sus mecanismos proteolíticos con una motilidad altamente organizada que permite la invasión de lugares recónditos. Un papel fundamental en este proceso degradativo se atribuye a una familia de enzimas dependientes de metal que se asocian con tumores invasivos [150,151,154-156]. Las células tumorales se intravasan cuando existe un aumento de la actividad proteolítica que permite invadir los tejidos del huésped y cruzar la matriz intersticial para llegar a la vascularización. Entre las proteasas las mejores conocidas son las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y el sistema activador del plasminógeno urokinasa (APU) y su receptor (APUR). Las MMPs son una familia de más de 20 proteínas que de manera conjunta degradan todos los componentes conocidos de la matriz extracelular. Su capacidad degradativa permite a las células tumorales migrar por la matriz extracelular (MEC). Cada MMP tiene la habilidad de degradar un tipo particular de proteínas de la matriz, implicándose en la invasión tumoral [157]. Estudios *in vivo* que miden la capacidad de penetración celular sobre una membrana basal reconstituida demuestran que existe una correlación entre la actividad MMP y la invasividad. Cuando aumentan los niveles de MMPs aumenta la invasión, y al contrario [158]. La regulación de MMPs es un complejo proceso, mediado en parte por inhibidores tisulares específicos (TIMP-1 y TIMP-2, mayoritariamente); así como por el factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF) [157] y por interleukina-8 (IL-8) [159]. Hace tiempo se pensó que la actividad MMP solamente funcionaba en el proceso metastásico, pero hoy se sabe que dicha actividad funciona en múltiples etapas de la progresión tumoral, incluida la angiogénesis [160,161].

#### 1.4.1. LA FAMILIA DE LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ (MMPs)

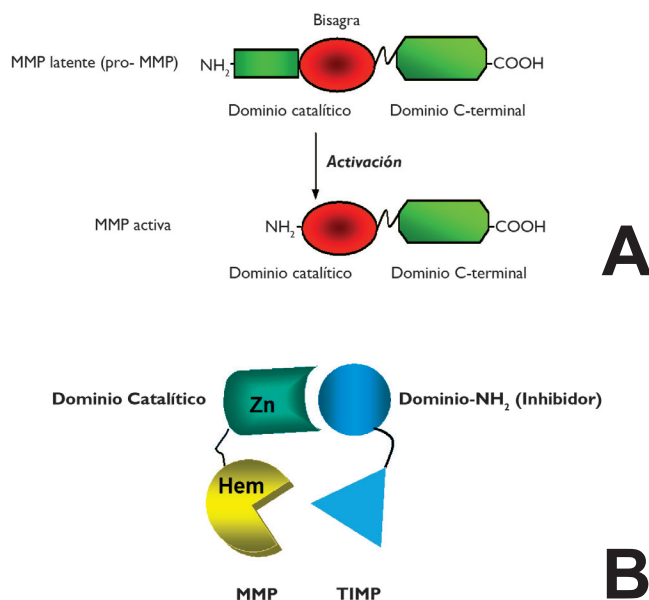
Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son un grupo importante de endopeptidasas dependientes de zinc que regulan la integridad y la composición

de la membrana extracelular, de acuerdo con su capacidad para romper uno o varios de sus componentes. Los miembros de la familia MMP comparten elementos estructurales comunes que incluyen un propéptido N-terminal, que mantiene la latencia en las formas zimogénicas, un lugar catalítico que contiene zinc, y un dominio C-terminal que se conoce como el dominio tipo hemopexina. Las modificaciones de esta estructura de organización básica estructural separan a los miembros de la familia MMP en cinco subgrupos mayores: colagenasas, estromelisin, matrilisin, gelatinasas y metaloproteinasas tipo membrana (MT-MMPs) (TABLA IV, Figura 7). Las gelatinasas contienen una región tipo fibronectina adicional intercalada con el dominio catalítico que se piensa involucrado en la unión con el colágeno.



**Figura 7.** Diferentes tipos de MMPs según su composición molecular.

Las MT-MMPs contienen un único dominio transmembrana que juega un papel en el anclaje del enzima a la membrana plasmática [156,162,163] (Figura 8). Dentro del dominio catalítico hay dos átomos de zinc, uno (el zinc catalítico) se encuentra presente en el sitio activo y está involucrado en la activación enzimática que sucede después de la ruptura de la región del propéptido. Se cree que el otro átomo de zinc juega un papel estructural [164,165]. El dominio tipo hemopexina funciona como un elemento de unión del sustrato y, en el caso de las formas latentes de gelatinasas, también interactúa con los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), una familia de cuatro proteínas de bajo peso molecular que inhibe de manera eficiente la actividad MMP mediante la unión al dominio catalítico (Figura 8).



**Figura 8** (A) Estructura de dominios básica de MMPs. El dominio catalítico es el responsable de la activación de pro-MMP. La MMP activa puede unirse al colágeno tipo IV desnaturalizado (gelatina). (B) Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) ejercen su función inhibitoria uniéndose al dominio catalítico de dichas metaloproteinasas (MMP), inactivándolas.

Massova et al. analizaron las secuencias enteras de los dominios catalíticos y de los dominios tipo-hemopexina en los 64 miembros de la familia MMP con intención de conocer su evolución, estructura e interacciones con diversos sustratos e inhibidores. Esta investigación dio lugar a 23 agrupamientos o subgrupos con similar composición, llevando a la hipótesis de que la unión de dominios en estas proteínas tuvo lugar en un estado temprano de diversificación, existiendo unas proteínas sencillas de dominio único que pasaron un proceso de fusión genética que generó los complejos enzimas multidominio [166]. Todos los tipos de MMPs se producen por enzimas latentes o zimógenos, también conocidos como pro-MMPs que requieren ser activados para convertirse en proteolíticamente activos. De hecho, la activación de pro-MMPs es un paso importante en la regulación de la proteólisis mediada por MMPs. Dos miembros de la familia de MMPs son particularmente importantes en la invasión de las células tumorales y en la angiogénesis,  $M_r$  72.000 (MMP-2 o gelatinasa A) y  $M_r$  92.000 (MMP-9 o gelatinasa B). Las MMPs, inicialmente conocidas como colagenasas tipo IV, debido a su particular propiedad de hidrolizar el colágeno tipo IV de la membrana, que constituye una barrera principal para las células invasoras y un paso clave durante la angiogénesis [151,154,167,168]. Como todos los miembros de la familia de MMPs, la actividad de MMP-2 y MMP-9 se regula en diferentes niveles, que incluyen transcripción, secreción, activación e inhibición por TIMPs [169,170].

#### 1.4.2. METALOPROTEINASA DE LA MATRIZ TIPO 2 (MMP-2)

La gelatinasa A o MMP-2, denominada así, por su afinidad por el colágeno tipo IV desnaturalizado, con un peso molecular de 72 y 62 kDa para la pro-enzima y la enzima activa, respectivamente, presenta una estructura común con otras MMP, formada por un pro-péptido con un dominio catalítico N-terminal, que contiene zinc y un dominio C-terminal tipo hemopexina. A diferencia de otras MMPs, posee un exoreceptor adicional en el dominio catalítico, el cual se denomina Dominio Fijador de Colágeno (*Collagen Binding Domain* / CBD), compuesto a su vez por

tres repeticiones homólogas tipo fibronectina II [171,172]. El CBD es el dominio principal responsable del reconocimiento del sustrato [173] (colágeno tipo IV o gelatina; de ahí el nombre de gelatinasas).

La MMP-2 se expresa en casi todos los tejidos humanos, sobre todo, en los fibroblastos y las células endoteliales y epiteliales. En condiciones fisiológicas, existe una concentración sérica detectable de la enzima y su actividad está ligada a procesos homeostáticos. Su actividad está íntimamente regulada por TIMP, en concreto TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. La actividad biológica de la enzima está asociada a una plétora de procesos fisiopatológicos, como enfermedades neoplásicas, cardiovasculares y procesos autoinmunes.

MMP-2 contribuye en el proceso de carcinogénesis de los tumores uroteliales y de próstata [174], y en la mayoría de los casos, la sobreexpresión de MMP-2 se asocia a peor pronóstico [175]. En las fases iniciales, MMP-2 es crucial en el desarrollo de un microambiente favorable para el crecimiento de las células tumorales y contribuye a la transición epitelio-mesénquima. La adquisición del fenotipo mesenquimal es un distintivo de las células tumorales, las cuales pierden su morfología tisular específica a favor de un fenotipo dediferenciado apto para la migración e invasividad [176]. La contribución de MMP-2 a la invasión incluye diferentes aspectos: i) degradación de la membrana basal (colágeno IV, laminina y fibronectina), lo cual permite la migración celular al torrente sanguíneo; ii) liberación de factores bioactivos; y iii) exposición de sitios de adhesión ocultos que conducen motilidad celular. MMP-2 también activa citocinas, factores de crecimiento, modula el metabolismo de las células tumorales, la resistencia celular a la apoptosis y angiogénesis.

MMP-2 también interactúa en procesos no tumorales de índole cardiovascular como la aterosclerosis, el infarto de miocardio e ictus [177,178] y enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple [179] y la artritis reumatoide [180].



### 1.4.3. METALOPROTEINASA DE LA MATRIZ TIPO 9 (MMP-9)

La gelatina B o MMP-9, con un peso molecular de 92,85 y 82 kDa para la pro-enzima, forma intermedia y enzima activa, respectivamente, posee una estructura homóloga a MMP-2 con la excepción de un dominio de enlace O-glicosilado más largo, lo que confiere una extraordinaria flexibilidad a la enzima, siendo esta característica su principal distintivo. El dominio catalítico de MMP-2 y MMP-9 posee una estructura similar; la principal diferencia es la presencia de Asp410, en lugar de Glu en S2 [181]. El Dominio Fijador de Colágeno (CBD), se localiza en la porción terminal del dominio catalítico, pero con una orientación distinta de MMP-2 [182].

Se ha identificado su presencia en diferentes procesos inflamatorios, cardiovasculares, autoinmunes (lupus eritematoso sistémico), enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), osteoarticulares y neoplasias, entre las que se encuentran el cáncer de vejiga y de próstata. Los niveles séricos de MMP-9 son casi indetectables en condiciones fisiológicas, lo que hace que el valor diagnóstico y pronóstico de cuantificación de la enzima, tenga un valor significativo, por lo tanto, concentraciones elevadas de MMP-9 se asocian generalmente a peor pronóstico de la enfermedad tumoral [183].

Debido a su alta afinidad por el colágeno tipo IV, históricamente se ha identificado como una proteasa degradadora de la membrana basal y estrechamente relacionada con invasión tumoral, aunque también contribuye al control de la división celular, confiriendo resistencia a la apoptosis y como activador de angiogénesis mediante un complejo proceso que incluye la liberación de VEGF [184].

### 1.4.4. INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASA TIPO 2 (TIMP-2)

La principal función de las MMPs es el crecimiento tisular y su remodelación mediante degradación proteolítica selectiva. Sin embargo, para evitar el recambio sin control de la matriz extracelular, su papel en procesos

inflamatorios, así como el crecimiento y la migración celular, la actividad de las MMPs, bajo condiciones fisiológicas, está regulada por inhibidores endógenos. La regulación endógena de las MMPs se realiza en tres niveles, que comprenden la transcripción genética, activación zimogénica e inhibición de la actividad enzimática.

Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (*tissue inhibitors of metalloproteinases/TIMPs*) son inhibidores endógenos naturales específicos, implicados en la remodelación de la matriz extracelular mediada por MMPs, en la remodelación tisular y en el comportamiento celular. En humanos han sido identificados 4 diferentes TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, las cuales comparten aproximadamente un 40% de homología. Todas ellas, presentan dos dominios diferentes, un dominio C-terminal y un dominio N-terminal. La región N-terminal se une al dominio catalítico de las MMPs e inhibe su actividad. La región TIMP C-terminal interacciona con el dominio hemopexina de pro-MMP-2 y pro-MMP-9 para estabilizar la pro-enzima.

Aunque los TIMPs fueron inicialmente catalogados como inhibidores de las MMPs, esta función constituye sólo una parte importante de su actividad, entre otros papeles relevantes, son los encargados de la modulación de la proliferación, migración e invasión celular y están implicados en procesos de angiogénesis y apoptosis [185].

#### 1.4.5. PAPEL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE MMPs Y TIMPs EN LA ENFERMEDAD NEOPLÁSICA

La sobreproducción de MMPs por tumores que interactúan con los sistemas linfáticos y vasculares puede producir niveles aumentados de MMPs y TIMPs, no solo en los tejidos sino también en otros fluidos biológicos como la sangre o la orina. Diversos estudios han destacado la existencia de patrones de expresión y sobreexpresión de MMPs y TIMPs, y las implicaciones potenciales para

los pacientes. Estos estudios se han beneficiado de la ventaja que proporcionan los grandes progresos llevados a cabo en la medicina molecular en las pasadas décadas, que han permitido el desarrollo de importantes herramientas de diagnóstico como RT-PCR, hibridación in situ, inmunohistoquímica y zimografía, por mencionar algunas, que sirven para estudiar la expresión de MMPs en pacientes con cáncer.

El papel de las MMPs y TIMPs han sido puntos clave para la investigación en diversas neoplasias malignas humanas que incluyen mama [186-188], colon [187], próstata [189-191], ovario [192] y vejiga [193-195]. De manera especial en el cáncer vesical las gelatinasas pueden tener un papel dual sobre el crecimiento y la diseminación tumoral. La comprensión de los mecanismos reguladores entre MMPs y TIMPs, podría permitir el desarrollo de inhibidores sintéticos de MMPs que sirvieran como aproximación terapéutica al cáncer, limitando el crecimiento y la diseminación tumoral al romper alguno de los procesos esenciales para la progresión maligna.

#### 1.4.6. NUEVAS ABORDAJES TERAPEÚTICOS CON INHIBIDORES SINTÉTICOS DE MMPs

A medida que nuevos estudios corroboran la correlación existente entre la expresión y la activación de MMPs y la progresión del cáncer, numerosos laboratorios y compañías farmacéuticas han dedicado sus esfuerzos a desarrollar nuevos compuestos sintéticos que podrían bloquear o neutralizar la acción de las MMPs. Para tener éxito estos compuestos deben tener ciertas propiedades como la biodisponibilidad, alta solubilidad y baja toxicidad. La mayoría de los inhibidores de MMPs generados hasta hoy son agentes de amplio espectro, basados en hidroxamato, que tienen como diana a la mayoría de los miembros de la familia de MMPs. Batimastat fue el primero de estos agentes en ser probado con resultados prometedores en modelos animales [196-199]. No obstante, su falta de biodisponibilidad ha constituido un freno en su desarrollo. Otras drogas de segunda generación, como Marimastat, con un perfil

similar pero con solubilidad mejorada, está siendo estudiada en estudios en fase III para pacientes con diversas formas de cáncer. Recientemente se ha introducido un inhibidor de MMP-2 de nuevo mecanismo, llamado SB-3CT. Este inhibidor no persigue la estrategia de quelar el metal para inhibir la actividad gelatinasas, sino que a diferencia de los otros inhibidores desarrollados con anterioridad muestra una inhibición irreversible de alta afinidad para MMP-2 [200]. Estos resultados son muy prometedores y sugieren un importante papel para estos nuevos agentes citostáticos antineoplásicos en el futuro.

### 1.5. EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER DE VEJIGA

Avances recientes llevados a cabo en el conocimiento de la biología molecular del cáncer vesical han contribuido al refinamiento de la manera de graduar y estadificar esta enfermedad. Los hallazgos obtenidos gracias a la biología molecular podrían jugar un papel importante para refinar aún más la estadificación encaminada a la predicción de pronóstico [201]. Se han estudiado en profundidad los marcadores moleculares que identifican las subclases de carcinoma vesical que recurren o progresan a enfermedad infiltrante. Los tumores vesicales presentan un número importante de alteraciones genéticas en el momento del diagnóstico. Existe un importante cuerpo de trabajo que demuestra que los tumores papilares superficiales (pTa) difieren de las lesiones *in situ* (Cis) y de los tumores músculo invasivos en su patogénesis molecular y en los caminos de progresión. Entre los sucesos moleculares que caracterizan a los tumores de vejiga superficiales destacan las deleciones que afectan al brazo largo del cromosoma 9, y la activación de ciertos oncogenes, como *H-RAS*; pero estas alteraciones se han identificado sólo en un subgrupo de neoplasias infiltrantes de vejiga [202]. El segundo camino incluye la inactivación de p53 en el cromosoma 17 (17p11.3) y de Rb en 13q14, cambios adscritos al carcinoma *in situ* y a los tumores pT1. Se han descrito numerosos biomarcadores que se correlacionan en mejor o peor manera con el estadio tumoral y con el pronóstico de los pacientes.

La identificación reciente de genes sobreexpresados en el cáncer vesical proporciona la oportunidad para establecer unas formas más sensibles y específicas de identificar la enfermedad metastásica. Por otro lado, la detección de células tumorales circulantes tiene unas implicaciones cruciales en el pronóstico y en el tratamiento de los pacientes con cáncer vesical. En los últimos años se han desarrollado protocolos basados en RT-PCR que permiten la detección de células neoplásicas en sangre periférica, médula ósea, y ganglios linfáticos de pacientes con varios tipos de cánceres, como el de mama, colon, melanoma, neuroblastoma, próstata, y linfoma [203,204].

Gazzaniga et al [205] fueron pioneros en el estudio de la estadificación molecular en el cáncer de vejiga y describieron alta sensibilidad y especificidad de los estudios basados en ensayos de RT-PCR para el receptor del factor epidérmico de crecimiento (EGFR) en la detección de células tumorales circulantes en muestras de sangre procedentes de pacientes con diagnóstico de cáncer vesical primario [206-208].

Muchos otros marcadores han sido empleados y los resultados no han sido concluyentes. De hecho, podemos asegurar que no existe un marcador tipo Antígeno Prostático Específico (PSA) en el cáncer de vejiga. Los marcadores tumorales comercialmente disponibles para esta enfermedad mediante técnicas de enzimoanálisis son BTA Stat, BTA TRAK (Bion Diagnostics, Redmond, Washington) y NMP22 (Matritech, Cambridge, Massachusetts), no obstante no han alcanzado amplia difusión para evitar técnicas de estudio invasivas en el diagnóstico o seguimiento de estos pacientes [209-211]. El test Immunocyt (Diagnostik, Inc., Saint-Foy, Quebec, Canada), que ha sido introducido más recientemente, combina un ensayo de inmunofluorescencia con la citología urinaria clásica [212]. El test HA-HAase tiene una aplicación exclusiva en investigación y mide ácido hialurónico y hialuronidasa mediante inmunoabsorbancia enzimática [213]. Existen otros métodos de detección molecular como análisis de microsatélites, protocolos

de amplificación telomérica mediante RT-PCR en células exfoliadas de la orina o marcadores epigenéticos (metilación anómala en diversos genes promotores), que se encuentran en investigación preclínica [214-216]. Al menos en teoría, el análisis mediante microarrays es la principal herramienta molecular potencial para facilitar el diagnóstico y para predecir el pronóstico de este tipo de pacientes. Tiene además la ventaja de que puede llevarse a cabo no solo en tejido, sino también en sangre y en orina. No obstante, los resultados obtenidos a día de hoy no son del todo concluyentes [217-218].

La metástasis indolente resulta difícil de detectar mediante estudios de imagen convencionales. La tecnología RT-PCR puede detectar un pequeño número de células tumorales en el torrente sanguíneo, en la orina, en ganglios linfáticos o en médula ósea. Pero a pesar de este atractivo potencial, tampoco se ha incorporado en la rutina asistencial. Diversos autores han evaluado el potencial de Uroplakina II (UPII), Citoqueratina 20 (CK20) o *FXD domain-containing ion transport regulator 3* (FXD3)

como marcadores de enfermedad metastásica ganglionar oculta mediante *Real Time* RT-PCR sin alcanzar conclusiones definitivas al respecto [219-221].

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Este trabajo se ha planteado en el contexto de una hipótesis conceptual global y a través de una hipótesis operativa más concreta. A partir de estas hipótesis se plantearán los objetivos que se pretende alcanzar con este trabajo.

#### 2.1.1. HIPÓTESIS CONCEPTUAL

El carcinoma de células transicionales de vejiga presenta un alto porcentaje de recidiva y los tumores Ta-I G3 y Cis, presentan además alta tasa de progresión a enfermedad músculo-invasiva, lo cual confiere un mal pronóstico vital en un número significativo de pacientes.

El tratamiento inicial de estos tumores es la RTU-vesical del tumor primario, asociada a instilaciones endovesicales de agentes quimioterápicos o de inmunoterapia (BCG), según diferentes esquemas en función de los diferentes grupos de riesgo. La respuesta al tratamiento es generalmente buena, pero a pesar de su correcto cumplimiento, un porcentaje elevado de casos no responderán al tratamiento o progresarán, precisando cistectomía precoz.

Por otro lado, los tumores músculo-invasivos de alto grado pueden desarrollar metástasis a distancia de forma oculta o silente durante el tratamiento primario o de forma temprana durante el seguimiento. El tratamiento radical en estos pacientes de peor pronóstico podría realizarse precozmente, mejorando así la tasa de supervivencia, si existieran variables predictivas de la evolución de éstas neoplasias.

En la actualidad, los mejores factores que predicen control de la enfermedad y supervivencia en el cáncer vesical, son meramente clínicos (tamaño, multiplicidad, grado,

categoría T, Cis asociado, afectación de la *muscularis mucosae*, afectación de la uretra prostática, tasa de recurrencia, respuesta a la BCG,...), pero su efectividad pronóstica es relativamente escasa. Sin embargo, muchos marcadores moleculares están siendo investigados en profundidad en el tejido neoplásico, la orina o la sangre para una supuesta correlación con la mayor probabilidad de diseminación a distancia. Por el momento no se han encontrado marcadores histológicos fiables de progresión, a excepción de la expresión de mutaciones de p53, cuya positividad puede ser empleada como marcador de mal pronóstico.

Un aspecto importante de la cascada metastásica es el proceso de degradación de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas específicas. Las células tumorales tienen la capacidad de juntar sus mecanismos proteolíticos con la motilidad de una manera altamente organizada para conseguir invasión en lugares inapropiados. Un papel fundamental en este proceso de degradación se atribuye a las metaloproteinasas de matriz (MMP).

Las Metaloproteinasas son una familia de endopetidases dependientes de zinc (actualmente, al menos 24 MMPs han sido aisladas en tejido humano), cuya principal función es degradar diversos componentes de la matriz extracelular y de las membranas basales, ocupando un lugar esencial en el proceso de invasión tumoral y metástasis a distancia. La actividad de MMP-2 y MMP-9 (gelatinasas) se regula a varios niveles, incluyendo la transcripción, secreción, activación e inhibición por inhibidores de tejido de metaloproteinasas (TIMPs).

Los inhibidores tisulares de Metaloproteinasas (TIMPs) son una familia de moléculas que aparte de su inhibición selectiva de MMPs, son capaces de inducir cambios en la morfología celular y en su crecimiento. La sobreproducción de MMPs por tumores que interactúan con los sistemas vascular y linfático podría dar lugar a niveles más altos de MMPs y TIMPs, no sólo en los tejidos sino también en otros fluidos biológicos, tales como la sangre o la orina. Muchos estudios han subrayado la sobreexpresión



de MMPs y TIMPs en el cáncer de vejiga. Considerando lo anteriormente expuesto, hemos planteado el estudio de una población de pacientes con carcinoma vesical en diferentes categorías clínico-patológicas y hemos analizado la expresión de metaloproteinasas (gelatinasas) y su inhibidor TIMP-2, analizando los principales datos anatomopatológicos y su evolución, en función de los datos de recurrencia, progresión y, muy especialmente, supervivencia cáncer específica. La finalidad de este trabajo ha sido conocer si estas moléculas pueden servir como marcadores pronósticos, su correlación con datos histológicos y clínicos, así como con la evolución de la enfermedad.

### 2.1.2. HIPOTESIS OPERATIVA

Existe evidencia para considerar que niveles altos de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, detectados bien mediante ELISA en suero o mediante RT-PCR a tiempo real en células mononucleares de sangre periférica, se asocian con neoplasia vesical de mayor riesgo de ser músculo-invasiva y de presentar progresión tumoral. La hipótesis de este trabajo se centra en considerar que la detección en linfocitos en sangre periférica de ARNm para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 mediante RT-PCR a tiempo real y la determinación sérica de los niveles proteicos de esos mismos marcadores, mediante técnica de ELISA, pueden establecer de manera no invasiva grupos de diferente pronóstico, en pacientes con cáncer de vejiga, e incluso diferenciar entre pacientes con cáncer (casos) e individuos sanos (controles).

## 2.2. OBJETIVOS PROPUESTOS

De la hipótesis planteada derivan los objetivos que deben alcanzarse con un trabajo apropiadamente diseñado. Estos objetivos pueden estructurarse en orden jerárquico como objetivo principal y objetivos secundarios.

### 2.2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal del estudio consiste en cuantificar la expresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en células de sangre periférica y suero de pacientes con cáncer vesical (casos) e individuos sanos (controles) para valorar así su posible empleo como marcador molecular con utilidad diagnóstica para la detección de carcinoma vesical.

Para ello hemos decidido estudiar la determinación de los niveles de gelatinasas y TIMP-2 con un doble método: 1. Por un lado estudiamos los niveles de ARN mensajero empleando RT-PCR a tiempo real de células de sangre periférica, lo que permite llevar a cabo un análisis semicuantitativo de la expresión génica; 2. Por otro lado, evaluando los niveles séricos de proteína mediante técnicas de inmunoanálisis (ELISA) de forma cuantitativa.

### 2.2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Como objetivos secundarios nos centraremos en el análisis de las determinaciones de metaloproteinasas y su inhibidor (TIMP-2) implicados en el remodelamiento de la matriz extracelular y en la progresión metastásica del cáncer vesical. Así, se pretende:

I. Determinar si existe correlación entre los valores séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y los cocientes de MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-2 y MMP2/MMP-9 y las diferentes variables clínico-patológicas: edad, sexo, categoría T, grado tumoral y presencia o no de metástasis a distancia. Esto nos permitirá establecer si existen diferencias, en los niveles séricos de metaloproteinasas, entre tumores vesicales menos agresivos (Ta-T1 de grado bajo o intermedio) y tumores de comportamiento más agresivo (T2-T4 de alto grado), así como ante la presencia o no de enfermedad a distancia (metástasis).

2. Evaluar la expresión de niveles normalizados de ARNm, obtenido de células circulantes en sangre periférica, mediante RT-PCR a tiempo real, de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en pacientes con cáncer vesical. Establecer diferencias entre los pacientes con cáncer vesical según categoría T, grado tumoral y la presencia o no de metástasis. Para simplificar los resultados y encontrar diferencias entre los pacientes con cáncer de vejiga a estudio, de forma práctica se establecerán 4 niveles clínicos de enfermedad:

- ✓ Ta (no invasivo)
- ✓ T1 invasivo de la lámina propia (microinvasivo)
- ✓ T2-4M0 invasivo del músculo o más allá (abiertamente invasivo) no metastático
- ✓ T2-4M1 (metastático)

3. Valorar la eficacia de un índice propuesto, con la finalidad de aumentar la capacidad de estadificación tumoral. Se propone el índice:  $(MMP-9+MMP-2)-TIMP-2/(MMP-9+MMP-2)$ , basado en el efecto aditivo de gelatinasas MMP-9 y MMP-2 y el efecto inhibitorio de TIMP-2, que contrarresta la actividad de MMP-2.

4. Valorar la utilidad de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 como marcadores moleculares de pronóstico y evolución de la enfermedad, basado en la tasa de recurrencia, tasa de progresión y supervivencia cáncer-específica de la serie y los valores séricos de metaloproteinasas analizados.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. SUJETOS A ESTUDIO

Se ha realizado un estudio prospectivo, no aleatorizado, con 42 sujetos, 31 de los cuales fueron pacientes con cáncer vesical diagnosticados y tratados en nuestro centro, en el periodo comprendido entre agosto de 2004 y marzo de 2006, y 11 controles sanos. Todos los pacientes recibieron RTU-vesical del tumor primario y en 10 se realizó cistoprostatectomía radical por carcinoma vesical músculo-invasivo. Todos los pacientes dieron su consentimiento para donar material biológico, de acuerdo con los requisitos del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Getafe para la realización de estudios de investigación con muestras biológicas anonimizadas.

##### 3.1.1. PACIENTES

Se realizó el seguimiento clínico de los pacientes del estudio y tratamiento según *lex artis*. Se recogieron los datos según un protocolo establecido previamente que incluía las siguientes variables: filiación del paciente y número de biopsia asignado por el Servicio de Anatomía Patológica, edad, sexo, estadificación locorregional y a distancia (TNM), grado tumoral (OMS 1973), recurrencia tumoral y fecha, progresión tumoral y fecha, supervivencia cáncer específica, tiempo de seguimiento y estado actual. Todos los seguimientos fueron actualizados a fecha 15 de julio de 2013.

##### 3.1.2. CONTROLES

De los 42 sujetos incluidos en el estudio, 11 fueron individuos sanos (controles), con equivalencia entre casos y controles respecto a sexo y edad, que donaron voluntariamente muestras de sangre específicamente para el estudio.

Se ha confirmado que ninguno de estos controles a fecha actual ha desarrollado enfermedad tumoral alguna. Todos los controles dieron su consentimiento informado por escrito, para donar material biológico, de acuerdo con los requisitos del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Getafe.

### **3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Todos los pacientes objeto del estudio donaron muestra de sangre periférica y muestra representativa de tejido tumoral resecado. Los controles sanos donaron solamente sangre periférica. El estudio se llevó a cabo en colaboración con la Unidad de Investigación (Antonio Ferruelo, Biólogo), con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Getafe (José María Rodríguez, Especialista en Anatomía Patológica) y con la ayuda de médicos residentes del Servicio de Urología (Carlos Pascual, Nuria Rodríguez, Ana García y Gina Torres).

#### **3.2.1. SUERO**

Bajo condiciones asépticas se obtuvieron muestras de sangre periférica de los pacientes a estudio en el momento de la inducción anestésica antes de iniciar la RTU-vesical, y en la extracción rápida matinal en los controles, empleando tubos de plástico (tubos BD cat#366703) sin activador de coágulo que evita la liberación de gelatinasas durante la activación plaquetaria y que coagula a temperatura ambiente.

Los tubos se centrifugaron en menos de 30' después de la extracción a 1.600 g durante 15 min a 4° C. El sobrenadante se congeló a -80° C hasta el análisis. Cada alícuota se empleó en una única ocasión para evitar la activación enzimática debida al proceso de congelación-descongelación.

### 3.2.2. CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Tal y como se ha señalado en el apartado anterior se obtuvieron de 9-12 ml por sujeto, recogidos en tubos que contienen EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Las muestras sanguíneas fueron remitidas de forma inmediata (menos de 2 horas) a la Unidad de Investigación del propio centro para su procesamiento inicial.

Se aisló la fracción de célula mononuclear como una capa intermedia por centrifugación en gradiente de densidad en presencia de Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) durante 20 minutos a 2.100 rpm a 4° C. El ARN total se prepara de células muestra usando Rneasy (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), según las instrucciones propuestas por el fabricante. La producción de ARN se determina mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm y las relaciones de densidad (OD260/OD280) se miden para asegurar la calidad de ARN aislado empleando el espectrofotómetro ND-100 (Nanodrop Technology). La relación media ha sido de 1,8 a 2,1 para todas las muestras. Para TI, una alícuota con 1-2 µg de ARN total de cada muestra se usa para la primera cadena de ADNc en un volumen total de 20-40 usando 0,75 µl (0,5 mg) de cebadores aleatorios (Promega, Madison, WI) y 0,5 µl (12,5 mmol/l) mezcla dNTPs (Ecogen, España), incubado a 70°C durante 10 minutos y enfriado inmediatamente sobre hielo para evitar la renaturalización. La siguiente mezcla TI se prepara en 10-20 µl para cada muestra: 4-8 µl buffer TI VLMM (5x) (Sigma), 0,5 µl (20 U) del inhibidor del RNase (RNasin, Promega) y 1 µl (100 U) del virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM) transcriptasa inversa e incubado a 25°C durante 5 minutos y 37°C durante 50 minutos, la reacción se para a 95°C durante 5 minutos para inactivar la TI.

### 3.2.3. TEJIDO TUMORAL

Tras la RTU vesical, el tejido resecado fue fijado en formalina, lavado para retirar el exceso de fijador e incluido en parafina según la técnica habitual. Se

realizaron cortes seriados de 3 ó 4 micras de espesor de cada uno de los bloques de parafina de las muestras del tumor; se introdujeron en un baño de flotación para su estiramiento y se rescataron con un portaobjetos, se calentaron para evaporar el agua y favorecer la adherencia de las muestras. Las placas se tiñeron con hematoxilina/eosina. Finalmente se realizó desparafinado y deshidratación de las muestras, previo a su estudio en el microscopio.

El diagnóstico anatomopatológico y la estadificación tumoral se realizó con los criterios de la AJCC (American Joint Committee on Cancer) de 2006 y el grado tumoral con la clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud) de 1973.

### **3.3. DETERMINACIÓN PROTEICA EN SUERO (ELISA)**

En las muestras de suero se determinó MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 séricas mediante técnica de ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), empleando los reactivos de la compañía R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA (MMP2: Cat# DMP2F0; MMP9: Cat# DMP900 y TIMP2: Cat# DTM200) siguiendo las especificaciones técnicas del fabricante. Cada grupo de muestras se analizó por triplicado.

Se llevó a cabo un ELISA disponible comercialmente (Quantikine® ELISA Human MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 Immunoassay, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Este ensayo se basa en la técnica cuantitativa del inmunoensayo enzimático en sandwich. Se utiliza un sustrato revestido con un anticuerpo monoclonal específico para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, en cuyos pocillos se pipetea la solución estándar del fabricante, los controles y las muestras. Las proteínas presentes quedarán ligadas al anticuerpo inmovilizado en el pocillo. Tras lavar cualquier sustancia que no haya quedado ligada al anticuerpo, se añaden anticuerpos policlonales específicos para cada una de las proteínas a estudio con una enzima ligada. Tras volver a aclarar cualquier sustancia que no haya quedado ligada, la solución con sustratos se añade

a los pocillos. La reacción enzimática produce una coloración azul que se convierte en amarilla al añadir la solución “de parada” (*stop solution*). La cantidad de color producido se relacionará directamente con la cantidad de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 ligadas en el paso inicial.

### 3.4. EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA

La muestra sanguínea fue remitida de manera inmediata al servicio de Investigación del propio centro para su procesamiento inicial. Se obtuvieron en cada muestra células mononucleares mediante un gradiente con Ficoll (Pharmacia Biotech, Amersham Biosciences, Upssala, Suecia) por centrifugación a 2100 rpm, durante 20 minutos a 4°C. El pellet de células se lavó 3 veces con PBS. Las células obtenidas mediante el gradiente de Ficoll fueron lisadas y se aisló el ARN total con el Rneasy Mini Kits (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

#### 3.4.1. EXTRACCIÓN DEL ARNm

El primer paso en la purificación del ARN es el aislamiento celular mediante centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll. De esta manera se obtienen diferentes capas. En la capa de las células mononucleares encuentran las células que expresan el gen buscado. Las células mononucleares y también las células tumorales, en el caso de que existan, son lisadas y se les extrae el ARN mediante técnicas de extracción de ARN total. Ahora bien, existen dos factores limitantes en la extracción del ARN. Por una parte la fácil degradabilidad de este compuesto, y por otra que la presencia de ADN genómico puede alterar el análisis.

El protocolo se compone de diversos pasos, que a continuación se describen brevemente. Las células en cultivo se lavan con PBS y posteriormente con tripsina al 0,10-0,25. Una vez se han desprendido las células se añade suero



que inactive la tripsina, se transfieren a un recipiente libre de ARN y se centrifuga durante 5 minutos a 1.500 rpm. Se aspira el sobrenadante y se añaden 350-600 µl de buffer RLT (con b- Mercaptoetanol) para lisar las células. Se procede a la homogenización de la muestra para exponer el componente genómico y reducir la viscosidad del lisado. Para homogenizar la muestra se pipetea la solución en una columna QIAshredder (Qiagen, USA) y se centrifuga durante 2 minutos a máxima velocidad. Se añade etanol (350-600 µl de etanol al 70 %) a la muestra para preparar las condiciones de unión del ARN en la extracción.

Se toman 700 µl de la solución y se centrifugan durante 15 minutos a 10,000 rpm en la columna apropiada. Tras retirar el sobrenadante el proceso se repite añadiendo buffer RWI y RPE para separar los contaminantes. El ARN se cuantificará mediante análisis espectrofotométrico a A260 nm y para comprobar su calidad y viabilidad se evaluó la absorbancia, a partir de la relación A260/280.

### 3.4.2. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA (RT)

Una vez se ha aislado el ARN, es necesario llevar a cabo el paso de ARN a cADN, conocido como fase de transcriptasa inversa (RT), para posteriormente amplificarlo repetidas veces mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y detectarlo con una electroforesis en gel de agarosa.

Para la síntesis de cADN, se toma una alícuota de 1 µg del ARN total, se añaden 0,5 µg de random hexamers (Promega, Madison, WI, USA) y se lleva a un volumen de 10 µl. Las muestras se incuban a 70°C durante 10 minutos y posteriormente se pasan a un recipiente con hielo. A continuación, se añaden otros 10 µl de la mezcla de reacción, siendo las concentraciones finales de los componentes las siguientes: 1mM de cada dNTP; 50 mM Tris-HCL (ph:8,3); 75 mM KCl; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 200 unidades/reacción de la enzima M-MLV transcriptasa inversa (Sigma, St Louis, MI, USA) y 20 unidades/reacción de inhibidor

de Rnasa, RNasin (Promega, Madison, WI). La mezcla de reacción se incubaba a 37°C durante 50 minutos, y la enzima MMLV se inactiva por calor a 90°C durante 10 minutos.

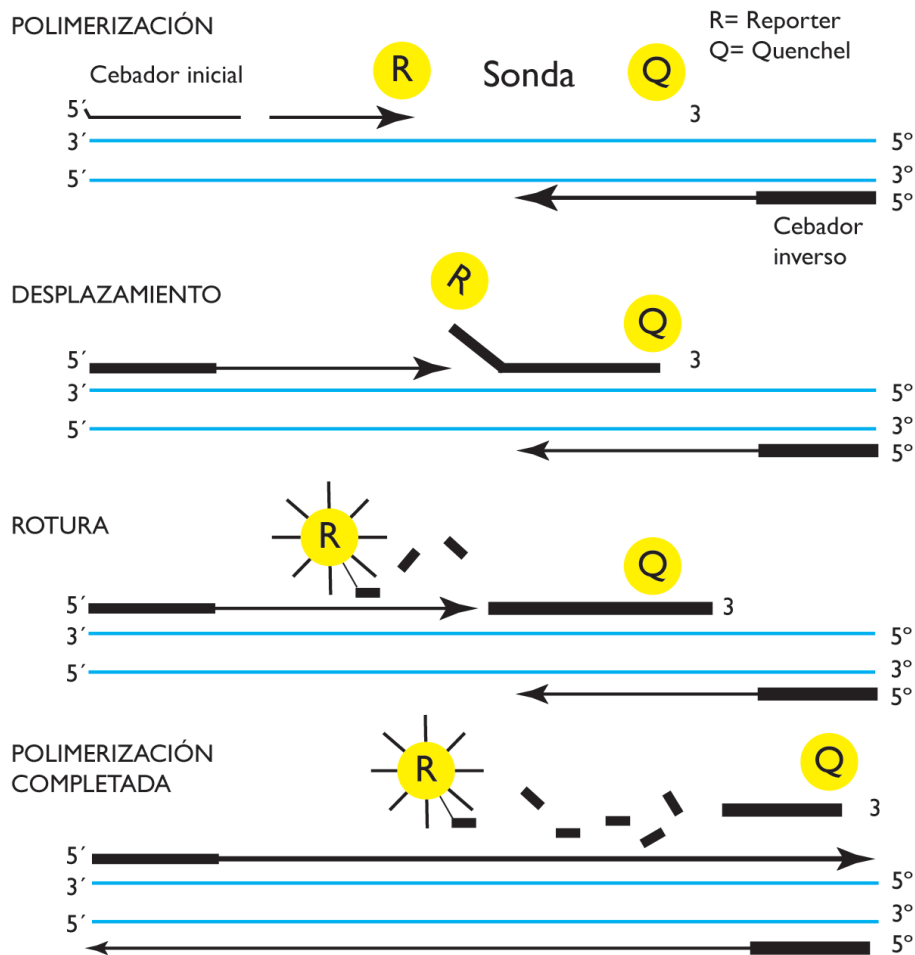
### 3.4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica el ADNc obtenido en la fase RT a partir del ARN total para conseguir la cantidad necesaria de ADN para su análisis molecular, mediante el enzima ADN polimerasa. Los fragmentos de ADNc codificadores del mensaje, son selectivamente amplificados en el paso de la PCR utilizando *primers* (cebadores) oligonucleótidos específicos del gen diana. Idealmente, una secuencia única de más de 20 pares de bases que flanquee al gen diana son los elegidos como *primers*.

La PCR consiste básicamente en la desnaturalización inicial del ADNc mediante calor en ADN de cadena simple, permitiendo el anillado de los cebadores a la cadena de ADNc en el extremo 3', en sentido 5'-3'. La extensión del cebador por la ADN polimerasa actúa en sentido 5'-3' y se sintetiza una nueva banda de ADN con la adición de nucleótidos trifosfato. De esta manera, después de un ciclo de PCR se obtienen 2 moléculas idénticas de ADN de doble cadena (ADNs). Esta reacción básica es repetida varias veces en diferentes ciclos (30 a 35 veces por ciclo), consiguiendo la amplificación exponencial de los genes diana, calculada en más de 1 billón. Los ensayos de expresión génica *Assays-on-Demand™* están diseñados para la detección y cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, mediante la utilización de cebadores y sonda *Taqman* marcada con el fluoróforo FAM para el gen a estudio.

El ensayo utiliza esta sonda fluorogénica que consiste en un oligonucleótido que lleva unido una molécula *Reporter* (FAM) en el extremo 5' y un *Quencher* en el 3'. En la PCR, la sonda se une a su zona complementaria entre los dos cebadores

utilizados para amplificar un fragmento determinado. Durante la extensión realizada por la Taq polimerasa, la sonda se rompe por acción de la actividad 5' nucleasa de la polimerasa, separándose *Reporter* de *Quencher*, al generarse un incremento en la intensidad fluorescente de la molécula *Reporter* que ya no es bloqueado por *Quencher*. Una vez separada, la molécula *Reporter* emite su fluorescencia característica, medida por el ciclador de PCR en tiempo real *iCycler* (Bio-Rad). Se obtiene así el valor *Ct* (*cycle threshold* o ciclo umbral) correspondiente (Figura 9).



**Figura 9:** Fases de actuación de la sonda *Taqman* en la PCR a tiempo real.

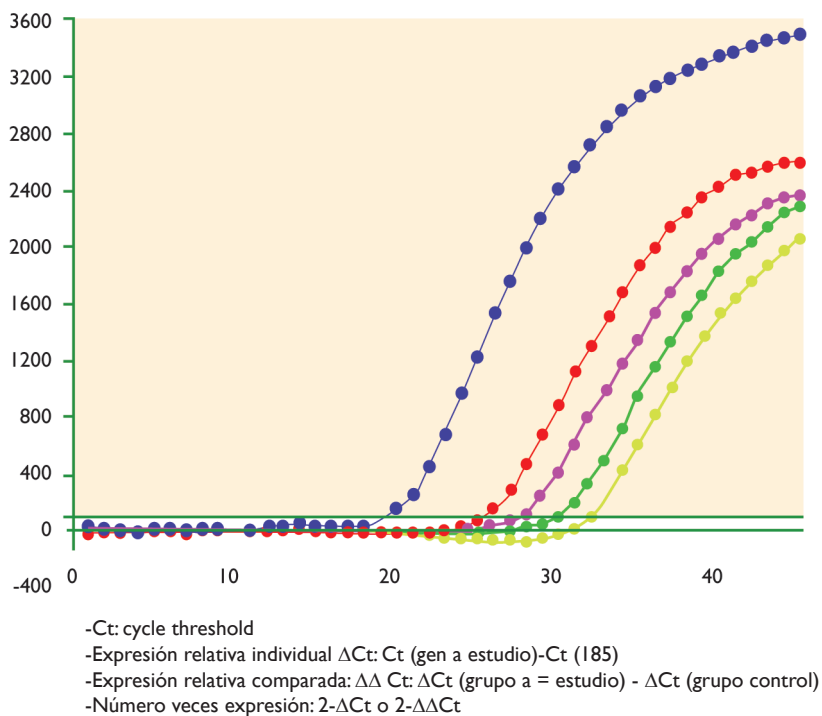
### 3.4.4. PCR A TIEMPO REAL

Para la valoración de la muestra anteriormente obtenida mediante PCR en tiempo real se ha empleado el ensayo *TaqMan* *Applied Biosystems* para cada uno de los genes a estudio. Estos ensayos están diseñados para determinar expresión génica y trabajar en condiciones universales mediante la utilización de sondas *Taqman* fluorescentes específicas del gen a estudiar.

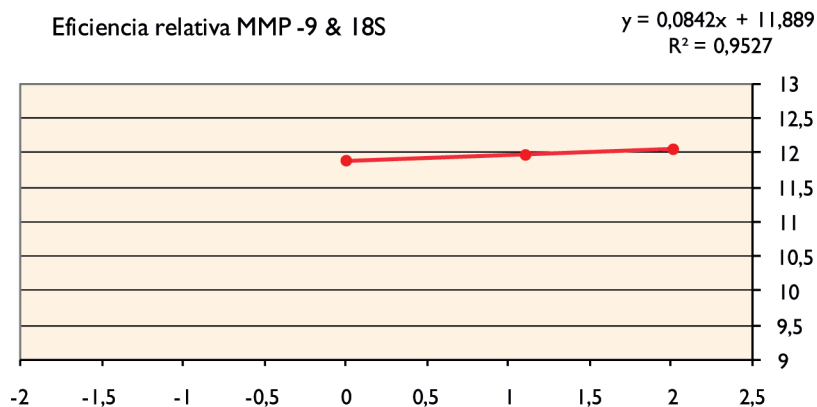
Como gen de referencia se utiliza el ARN ribosomal 18S. Se añadió 1 mg del ARN total de cada uno de los ensayos a un conjunto de cebadores para sintetizar ADNc mediante la reacción de la transcriptasa inversa, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma, St. Louis, MO, USA). La PCR se llevó a cabo en un ciclador *iCycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) con 25 µl de solución que contiene 12,5 µl de *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystem*, Holanda) y 1,25 µl de cebadores y sonda *Taqman*. La temperatura de ciclado fue 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Los resultados se expresan mediante el método de los Ct comparativos. Los valores Ct corresponden al número de ciclo en el cual la emisión de fluorescencia detectada es superior a un valor umbral considerado entre los primeros ciclos. Éste método consiste en determinar la expresión relativa de las muestras respecto a los controles para un marcador a estudio.

Esto se expresa como  $\Delta\Delta Ct$ , es decir, la relación de Ct de cada marcador respecto a su marcador de referencia (18S ribosomal) y la comparación de los Ct corregidos por el 18S de las muestras respecto a los controles del ensayo. El nivel de expresión relativo del gen diana es dado por la expresión  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gen diana}} - \Delta Ct_{\text{gen referencia}}$  (Figura 10).



**Figura 10:** Expresión gráfica de la amplificación génica mediante PCR a tiempo real.



**Figura 11:** Todos los valores de la variable x son inferiores a 0,1 lo que significa que las eficiencias entre ambos genes son equivalentes (superior al 95%) y valida el procedimiento.

Para que el cálculo comparativo sea válido, la eficiencia de la amplificación del gen diana debe ser aproximadamente igual a la amplificación del gen de referencia y por tanto, el valor absoluto de la pendiente del logaritmo de la cantidad del ADNc de entrada frente al Ct debe ser  $< 0,1$  (Figura 11). La PCR cuantitativa en tiempo real permite la detección de los productos de PCR conforme se van produciendo. De esta manera, conseguimos medir continuamente la cantidad de producto de PCR en cada uno de los ciclos y no solo al final, a través de la intensidad de fluorescencia. Para cuantificar la expresión relativa del ARN se empleó la técnica de PCR en tiempo real mediante el método del Ct comparativo, y se calcularon los cambios de expresión de los genes a estudio MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en cada situación evaluada, siempre con respecto a la situación control. La PCR en tiempo real se ha convertido en el mejor método de cuantificación del ARNm de un gen diana con aplicación potencial en el estudio de estadificación de la neoplasia urológica.

## 1.4. MÉTODO ESTADÍSTICO

El método estadístico aplicado en este trabajo es múltiple y se compone de diferentes análisis avanzados. Principalmente se ha empleado estadística descriptiva, comparación de medianas y comparación de niveles de expresión génica para establecer las diferencias entre casos y controles, y también diferencias entre diferentes grupos de casos. También se ha llevado a cabo análisis de curvas receptor operador (ROC) y estudio de eficacia diagnóstica para los valores séricos de diferentes marcadores después de establecer puntos de corte, y estudio de supervivencia para conocer las implicaciones pronóstico de las diferentes determinaciones estudiadas.

### 1.4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

La estadística descriptiva es la rama de las Matemáticas que recolecta, presenta y caracteriza un conjunto de datos con el fin de describir apropiadamente

las diversas características de ese conjunto. Pretende inferir o generalizar resultados de una muestra a una población. Se estudia en particular a un reducido número de individuos a los que tenemos acceso con la idea de poder generalizar los hallazgos a la población de la cual esa muestra procede. Este proceso de inferencia se efectúa por medio de métodos estadísticos basados en la probabilidad.

La naturaleza de las observaciones es de gran importancia a la hora de elegir el método estadístico más apropiado para abordar su análisis. Con este fin, las variables se clasifican, en cuantitativas o cualitativas. Para variables categóricas, como el sexo o la estadificación tumoral, se requiere conocer el número de casos en cada una de las categorías, reflejando habitualmente el porcentaje que representan del total, y expresándolo en una tabla de frecuencias. Para variables numéricas, en las que puede haber un gran número de valores observados distintos, se emplean medidas de tendencia central o medidas de dispersión.

Las medidas de centralización nos dicen alrededor de que valor se agrupan los datos. La medida más evidente para describir un conjunto de observaciones numéricas es su valor medio. La media no es más que la suma de todos los valores de una variable dividida entre el número total de datos de los que se dispone. Otra medida de tendencia central que se utiliza habitualmente es la mediana. Es la observación equidistante de los extremos, es decir, el valor que deja a la mitad de los datos por encima de un valor y a la otra mitad por debajo. Otro aspecto a tener en cuenta al describir datos continuos es la dispersión de los mismos. Existen distintas formas de cuantificar esa variabilidad, como la varianza ( $S^2$ ) o la desviación típica ( $S$ ), que es la raíz cuadrada de la varianza. En el caso de distribuciones asimétricas, la mediana y la amplitud son medidas más adecuadas. También se suelen utilizar además los cuartiles y percentiles. El percentil es el valor de la variable que indica el porcentaje de una distribución que es igual o menor a esa cifra. Por ejemplo, el percentil 80 es el valor de la variable que es igual o deja por debajo de sí al 80% del total de las puntuaciones. Los cuartiles son los valores de la variable que dejan por

debajo de sí el 25%, 50% y el 75% del total de las puntuaciones y así tenemos por tanto el primer cuartil (Q1), el segundo (Q2) y el tercer cuartil (Q3) [222-224].

#### 1.4.2. COMPARACIÓN DE MEDIANAS (U-Mann Whitney, Kruskal Wallis)

Cuando la variable cuantitativa sigue la distribución normal en todos los casos y las varianzas no son significativamente distintas, para la comparación de grupos se utilizará el test paramétrico t de Student. En cualquier otro caso se realizará el test no paramétrico, la U de Mann-Whitney, que compara las diferencias entre dos medianas. Las pruebas no paramétricas se pueden usar cuando dos series de observaciones provienen de distintas poblaciones y son la única alternativa cuando el tamaño de muestra es pequeño.

Las pruebas de comparación de más de dos variables sirven para comparar las medidas de tendencia central (media o mediana) de más de dos grupos de datos distintos, para determinar si las diferencias entre dichas medidas se deben al azar del muestreo o a diferencias reales entre los grupos que se están comparando. Relacionan una variable cualitativa de más de dos casos (variable independiente) con otra cuantitativa (variable dependiente). Los estados de la variable cualitativa designan dichos grupos. Se realiza el test de la F de Snedecor para comprobar la homogeneidad de las varianzas entre los distintos grupos. Si la variable cuantitativa sigue la distribución normal en todos los casos y las varianzas no son significativamente distintas, se utilizará el test paramétrico ANOVA. En cualquier otro caso se realizará el test no paramétrico Kruskal-Wallis.

#### 1.4.3. ANÁLISIS DE CURVAS RECEPTOR OPERADOR (ROC)

Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de dos características: la sensibilidad y la especificidad [225]. Sin embargo, éstas varían en función del criterio elegido como punto de corte entre la población



sana y la enferma. Una forma más global de conocer la calidad de la prueba en el espectro completo de puntos de corte es mediante el uso de curvas de receptor operador (*receiver operating characteristics* o ROC) que constituyen una herramienta fundamental y unificadora en el proceso de evaluación y uso de pruebas diagnósticas.

La curva ROC es un gráfico en el que se observan todos los pares sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. En el eje y de coordenadas se sitúa la sensibilidad o fracción de verdaderos positivos, calculada en el grupo de enfermos. En el eje x se sitúa la fracción de falsos positivos o 1-especificidad, definida como  $FP/VN + FP$  y calculada en el subgrupo no afectado. Cada punto de la curva representa un par S/I-E correspondiente a un nivel de decisión determinado.

Una prueba con discriminación perfecta, sin solapamiento de resultados en las dos poblaciones, tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde S y E toman valores máximos ( $S$  y  $E = 1$ ). Una prueba sin discriminación, con igual distribución de resultados en los dos subgrupos, da lugar a una línea diagonal de  $45^\circ$ , desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. Cuanto más próxima es una curva ROC a la esquina superior izquierda, más alta es la exactitud global de la prueba. De la misma forma, si se dibujan en un mismo gráfico las curvas obtenidas con distintas pruebas diagnósticas, aquella que esté situada más hacia arriba y hacia la izquierda tiene mayor exactitud. De esta forma el área bajo la curva (ABC) ROC es una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica [226].

#### 1.4.4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA (Método de Kaplan-Meier)

En muchos estudios quirúrgicos, y especialmente los relacionados con el cáncer, la variable principal que se quiere valorar es el tiempo que transcurre hasta un suceso. A este tiempo, normalmente se le llama “supervivencia”, aunque el suceso en cuestión no tiene por qué ser la defunción. Cuando el suceso a evaluar ocurre en todos los pacientes, entonces disponemos de varias técnicas estadísticas que pueden aplicarse. Sin embargo, lo más habitual es que el suceso en cuestión (la

defunción, la recidiva, la progresión) no se presente en todos los individuos. Cada paciente es seguido durante un determinado período recogiendo el intervalo que transcurre entre el hecho inicial y el hecho final, o hasta que acaba el seguimiento.

La probabilidad de supervivencia es la probabilidad de que un individuo sobreviva desde la fecha de entrada en el estudio hasta un momento determinado en el tiempo. Estos valores van a describir la supervivencia global de toda nuestra población. Incluso más interesante que la probabilidad de supervivencia, aunque muchísimo menos conocida, es la función de riesgo (HR), la probabilidad de que a un individuo que está siendo observado en el tiempo  $t$  le suceda el evento en ese momento.

La probabilidad de supervivencia se puede estimar de manera no paramétrica basándose en los tiempos de observación (censurados y no censurados) usando el método de Kaplan-Meier [227]. La curva de supervivencia es una representación de la probabilidad de supervivencia acumulada frente al tiempo.

#### 1.4.5. COMPARACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA (Método $\Delta\Delta C_t$ comparativo)

La cuantificación relativa o cuantificación comparativa de RT-PCR, mide el cambio relativo en los niveles de expresión de ARNm. Determina los cambios en los niveles de ARNm en estado estacionario de un gen a través de múltiples muestras y lo expresa con relación a los niveles de otro ARN. La cuantificación relativa no requiere una curva de calibración o estándares con concentraciones conocidas. Las unidades utilizadas para expresar cantidades relativas son irrelevantes y las cantidades relativas pueden ser comparadas a través de múltiples experimentos de RT-PCR en tiempo real, se trata realmente de un método de comparación semicuantitativo. Genes de expresión constante son elegidos como genes de referencia, los cuales pueden ser co-amplificados en el mismo tubo en un ensayo múltiple (como controles endógenos) o pueden ser amplificados en un tubo

separado (como controles exógenos). Para determinar el nivel de expresión génica, se miden las diferencias ( $\Delta$ ) entre el ciclo umbral (*threshold cycle* o  $C_t$ ). La expresión relativa de un gen de interés, en relación con otro gen se puede calcular empleando los valores “Delta Delta  $C_t$ ” ( $\Delta\Delta C_t$ ) [228] (Figura 11). Todos los métodos de la PCR cuantitativa asumen que la diana y la muestra amplifican con eficiencia similar [278]. El riesgo de las referencias externas es que algunas muestras analizadas pueden contener sustancias que influyan significativamente en la eficiencia de amplificación de PCR a tiempo real. La comparación de las escalas ponderadas entre grupos se realizó con la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Se consideró la significación estadística a nivel 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE

El estudio se llevó a cabo con 42 sujetos (36 varones, 6 mujeres), con edad media de 64 años (IC 95%: 59,7-68,3; rango: 29-90), que incluye como control individuos sanos ( $n=11$ ) y como caso pacientes con neoplasia vesical ( $n=31$ ). Se confirma la equivalencia entre casos y controles con respecto a las variables sexo (Test exacto de Fisher,  $p=0,64$ ) y edad (F de Snedecor,  $p=0,64$ ) (Tablas V y VI).

Tabla V. Sexo vs Grupo de pacientes						
SEXO	GRUPO				Total	
	CASO		CONTROL			
	N	%	N	%	N	%
HOMBRE	27	87,10	9	81,82	36	85,71
MUJER	4	12,90	2	18,18	6	14,29
Total	31	100,0	11	100,0	42	100,0

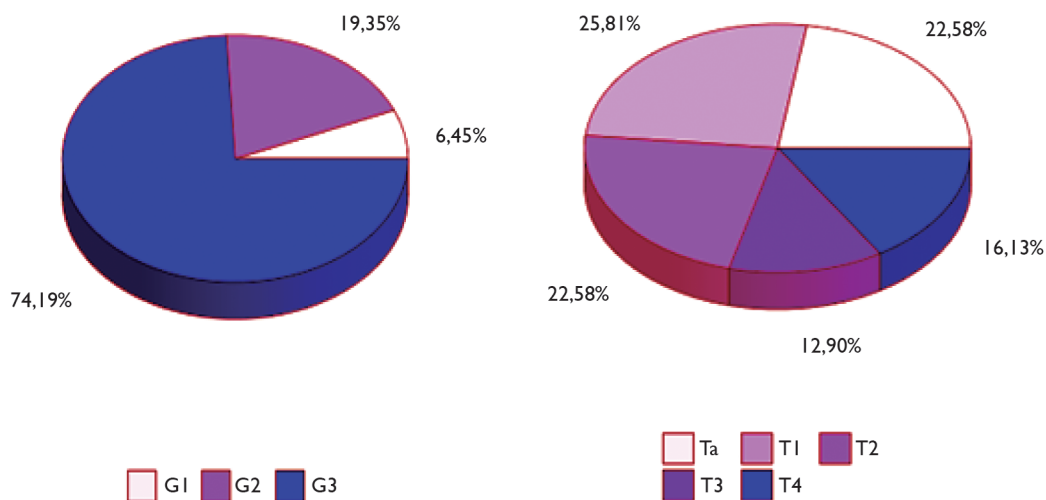
P(Test Exacto de Fisher)=0,644

**Tabla VI.** Edad vs Grupo de pacientes

EDAD		N	MEDIA	DESY. EST.	MIN.	MAX.	MEDIANA	IQR	IC MEDIA 95%. INF. SUP.	
GRUPO	CASO	31	59,90	11,71	31,00	79,00	63,00	19,00	55,61	64,20
	CONTROL	11	58,27	8,63	46,00	78,00	59,00	12,00	52,48	64,07
	TOTAL	42	59,48	10,91	31,00	79,00	59,50	17,00	56,08	62,88

P (F de Snedecor)=0,643

La distribución por categoría T de los pacientes con neoplasia fue: Ta (n=7), T<sub>1</sub> (n=8), T<sub>2</sub> (n=7), T<sub>3</sub> (n=4) y T<sub>4</sub> (n=5). Todos los pacientes recibieron resección transuretral primaria de la neoplasia vesical y 10 (32,3%) también cistectomía. El estudio preoperatorio reveló diseminación metastásica (M1) en 5 casos (16%) y el estudio histopatológico definió 2 tumores grado 1 (6,5%), 6 grado 2 (19,4%) y 23 grado 3 (74,2%) (Figura 12).

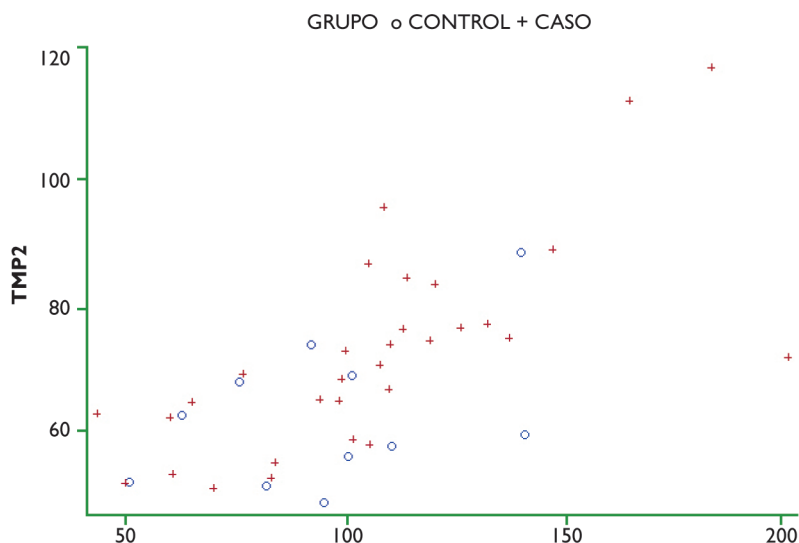


**Figura 12:** Distribución de los pacientes con cáncer vesical según categoría T (A) y según la asignación de grado histológico (B).

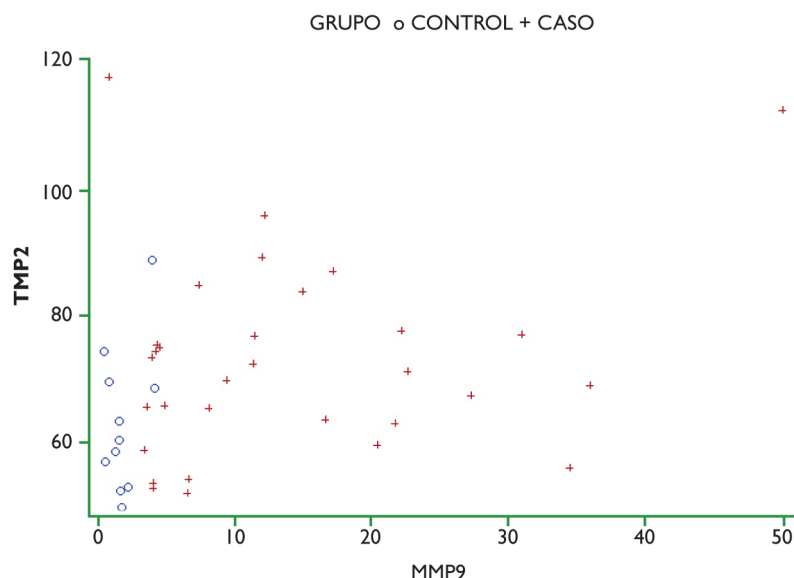
## 4.2. NIVELES PROTÉICOS DE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 EN SUERO

La determinación por triplicado de los niveles séricos de gelatinasas y del inhibidor TIMP-2 fue posible en todos los sujetos analizados ( $n=42$ ). La media de MMP-2 fue 103,1 ng/mL (desviación estándar 34,2 y rangos 43,1-200,5). La mediana para este mismo dato fue 101,2 ng/mL (rango intercuartílico 37,4 y el intervalo de confianza al 95% 92,5-113,8). Con respecto a MMP-9, la media fue 10,9 ng/mL (DE 11,6 y rangos 0,4-50,1) y la mediana 5,7 ng/mL (IQR 13,2 e IC 95% 7,25-14,5). El valor medio de TIMP-2 fue 70,4 ng/mL (DE 15,5 y rangos 49,5-118,5) y la mediana 68,8 (IQR 18,3 e IC 95% 65,6-75,3).

Se ha analizado la posible existencia de correlación entre estos valores, detectándose correlación entre las determinaciones de MMP-2 y TIMP-2 ( $R=0,699$ ;  $p>0,0001$ ); así como entre MMP-9 y TIMP-2 ( $R=0,305$ ;  $p=0,049$ ) (Figuras 13 y 14). Ahora bien, no se detectó correlación entre los niveles de MMP-2 y MMP-9 ( $R=0,126$ ;  $p=0,43$ ).



**Figura 13:** La distribución de los valores de MMP-2 y de TIMP-2 (expresados en ng/mL) muestra muy marcada correlación ( $R=0,699$ ;  $p>0,0001$ ).



**Figura 14:** La distribución de los valores de MMP-9 y de TIMP-2 (expresados en ng/mL) muestra correlación ( $R=0,305$ ;  $p=0,049$ ).

Se han establecido también dos cocientes: MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2. El primero de ellos muestra unos valores medios de 1,45 (DE 0,4, rangos 0,7-2,8) y una mediana de 1,46 (IQR 0,43, IC 95% 1,3-1,6), y el segundo media 0,15 (DE 0,13, rangos 0,01-0,6) y mediana 0,08 (IQR 0,15, IC95% 0,1-0,2). Debido al tamaño y características de la muestra en adelante emplearemos como referencia los valores de las medianas para establecer comparaciones entre grupos empleando el test U de Mann-Whitney (Tabla VII).

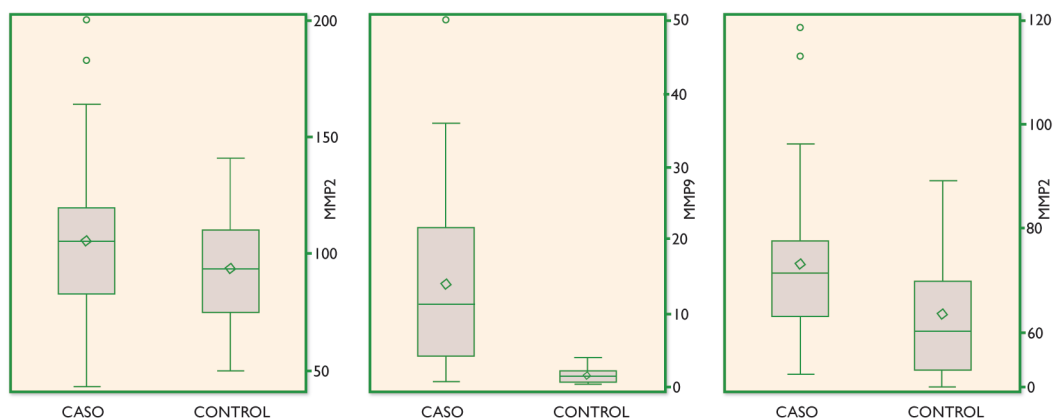
#### 4.3. DETECCIÓN DE CÁNCER BASADA EN NIVELES PROTÉICOS

Resulta fundamental analizar la distribución de los parámetros analíticos y fundamentalmente sus medianas, para establecer la capacidad que estos posibles marcadores tienen a la hora de diferenciar entre paciente con cáncer e individuo sano. La tabla VII muestra los valores de cada determinación, y de sus respectivos cocientes, tanto para la serie total (TOTAL) como para pacientes (NEOPLASIA) y para individuos sanos (CONTROL).

**TABLA VII.** Valores séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y sus respectivos cocientes

GRUPO	n	MMP-2 (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)	TIMP-2 (ng/mL)	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/ TIMP-2
<b>TOTAL</b>	42	101,24±37,36	5,67±13,21	68,78±18,26	1,46±0,43	0,08±0,15
<b>CONTROL</b>	11	94,84±34,62	1,54±1,39	60,23±16,84	1,56±0,78	0,02±0,03
<b>NEOPLASIA</b>	31	105,37±37,26	11,33±17,48	71,34±14,71	1,45±0,42	0,13±0,24
		<i>p=0,35</i>	<b><i>p&lt;0,0001</i></b>	<b><i>p=0,047</i></b>	<i>p=0,45</i>	<b><i>p&lt;0,001</i></b>

Los valores se expresan en Medianas ± rango intercuartílico. El valor de p corresponde al test U de Mann-Whitney. Los valores en negrilla alcanzan significación estadística.

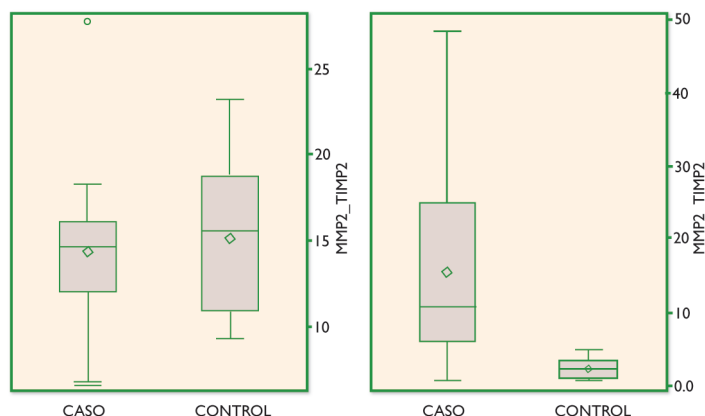


**Figura 15:** Comparación de medianas entre los valores de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 entre casos y controles (U Mann-Whitney;  $p<0,0001$  para MMP-9,  $p=0,047$  para TIMP-2).

No se detectaron diferencias entre los niveles séricos de casos y controles para MMP-2 (U Mann-Whitney;  $p=0,3$ ). Ahora bien, los niveles séricos de MMP-9 fueron significativamente mayores en pacientes con cáncer que en el grupo control (U Mann-Whitney;  $p<0,0001$ ) y los niveles de TIMP-2 también fueron significativamente mayores en pacientes con cáncer ( $p=0,047$ ) (Tabla VII). Estos datos se expresan de forma gráfica en la Figura 15.

No se detectaron diferencias entre pacientes e individuos sanos para los valores del cociente MMP-2/TIMP-2 ( $p=0,45$ ); pero sí existieron diferencias en el cociente MMP-9/TIMP-2 ( $p<0,001$ ) (Tabla VII).

Estos datos se expresan de forma gráfica en la Figura 16. En resumen, la determinación de MMP-9 y de TIMP-2, así como su respectivo cociente MMP-9/TIMP-2, muestra potencial utilidad para discriminar controles y casos en la serie analizada.



**Figura 16:** Comparación de medianas entre los valores de MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2 entre casos y controles (U Mann-Whitney;  $p<0,001$  para MMP-9/TIMP-2).

#### 4.4. ESTADIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD SEGÚN NIVELES PROTÉICOS

Una vez confirmado el valor discriminativo entre pacientes y controles, fundamental para plantear un papel diagnóstico, debemos centrarnos en los pacientes con cáncer vesical exclusivamente y analizar cómo las diferentes variables afectan la determinación analítica de estos posibles marcadores. Para ello se ha de



analizar por un lado el papel de variables clínicas fundamentales o constitutivas, como edad y sexo, y por otro el papel de otras variables clínico-patológicas que intervienen a la hora de definir grupos diagnósticos y terapéuticos en pacientes con cáncer vesical.

En la Tabla VIII se muestra la distribución de medianas de los parámetros analíticos según sexo y edad para establecer si estas variables afectan la determinación analítica en los pacientes con neoplasia vesical.

No se detectan diferencias entre grupos, por lo que podemos interpretar que no existe variación debida a estas variables demográficas entre pacientes con cáncer vesical.

<b>TABLA VIII.</b> Valores séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y sus respectivos cocientes en pacientes con neoplasia vesical según sexo y edad de los pacientes						
<b>VARIABLE</b>	<b>n</b>	<b>MMP-2 (ng/mL)</b>	<b>MMP-9 (ng/mL)</b>	<b>TIMP-2 (ng/mL)</b>	<b>MMP-2/TIMP-2</b>	<b>MMP-9/TIMP-2</b>
<b>SEXO</b>						
HOMBRE	27	107,59±43,19	11,38±17,73	72,4±14,12	1,45±0,42	0,13±0,24
MUJER	4	99,79±33,68	5,69±10,1	62,54±19,29	1,41±0,46	0,08±0,15
		<i>p</i> =0,38	<i>p</i> =0,26	<i>p</i> =0,29	<i>p</i> =0,79	<i>p</i> =0,38
<b>EDAD</b>						
<65 AÑOS	18	103,22±72,24	11,66±17,61	68,44±17,59	1,48±0,51	0,15±0,27
≥ 65 AÑOS	13	108,55±14,95	9,4±10,1	73,54±10,31	1,42±0,24	0,13±0,1
		<i>p</i> =0,72	<i>p</i> =0,81	<i>p</i> =0,49	<i>p</i> =0,95	<i>p</i> =0,72

Los valores se expresan en Medianas ± rango intercuartílico. El valor de *p* corresponde al test U de Mann-Whitney cuando se comparan dos variables.

Por otro lado, hemos analizado si diferentes variables clínico-patológicas que se consideran de importancia pronóstico en el cáncer vesical afectan o no la distribución de los marcadores analizados.

De ser así, se pondría en evidencia el posible valor de los mismos para la estadificación de la enfermedad basada en métodos no clínicos ni patológicos, sino analíticos o moleculares.

Se detectan diferencias de carácter significativo entre las categorías T para los valores de MMP-2 (Kruskal-Wallis;  $p=0,02$ ) y de MMP-9 ( $p=0,038$ ). También se aprecian diferencias relativas a los niveles de TIMP-2 para las categorías T, pero sin alcanzar la significación estadística establecida ( $p=0,06$ ).

Los valores más elevados de MMP-2 corresponden a tumores T3 y T4, y los de MMP-9 y TIMP-2 a tumores T4. No se detectan diferencias relativas a los cocientes MMP-2/TIMP-2 ( $p=0,1$ ) o MMP-9/TIMP-2 ( $p=0,08$ ) (Tabla IX, Figura 17).

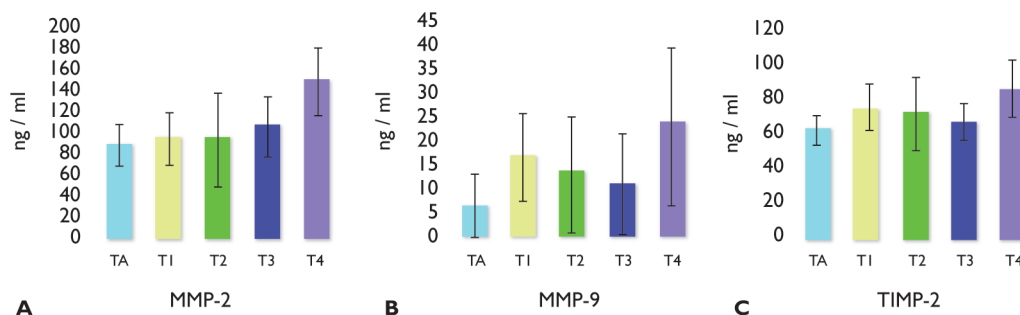
Con respecto a la categoría M, los niveles de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 fueron más elevados en pacientes con metástasis al diagnóstico, pero solo alcanzó significación estadística la diferencia entre los valores de TIMP-2 (U Mann-Whitney;  $p=0,04$ ), y no para MMP-2 ( $p=0,06$ ) o MMP-9 ( $p=0,52$ ) (Tabla IX, Figura 18). Tampoco discriminaron entre pacientes con o sin metástasis los cocientes MMP-2/TIMP-2 ( $p=0,573$ ) o MMP-9/TIMP-2 ( $p=0,707$ ).

Con respecto al grado histológico, posiblemente la característica histopatológica más inherente al carcinoma urotelial, ninguno de los compuestos analizados muestra diferencias en los diferentes grupos de pacientes con cáncer según el grado histológico definido por la OMS en 1973. Seguramente, la escasa muestra relativa a las lesiones de bajo grado afecte los resultados apreciados (Tabla IX).

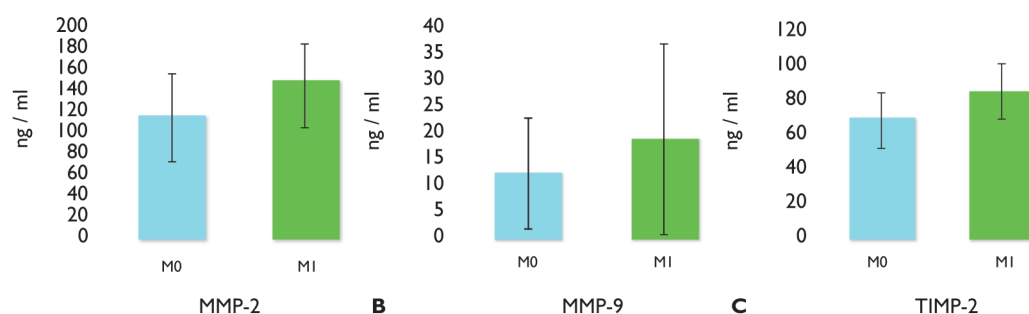
**TABLA IX.** Valores séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y sus respectivos cocientes en pacientes con neoplasia vesical según las variables clínico-patológicas

VARIABLE	n	MMP-2 (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)	TIMP-2 (ng/mL)	MMP-2/ TIMP-2	MMP-9/ TIMP-2
<b>T</b>						
Ta	7	98,2±22,62	3,98±1,27	65,54±17,99	1,49±0,2	0,07±0,02
T1	8	106,8±39,18	14,7±12,22	77,31±22,02	1,24±0,35	0,17±0,19
T2	7	98,81±49,48	9,4±16,25	69,0±14,87	1,43±0,45	0,13±0,29
T3	4	114,34±38,24	5,48±12,55	71,29±15,83	1,6±0,26	0,09±0,21
T4	5	147,03±38,47	14,94±19,01	84,05±12,46	1,63±0,19	0,18±0,25
		<b>p=0,02</b>	<b>p=0,04</b>	<b>p=0,06</b>	<b>p=0,1</b>	<b>p=0,08</b>
<b>M</b>						
M0	26	103,22±30,13	9,73±17,61	68,2±17,39	1,44±0,38	0,13±0,24
M1	5	136,88±27,02	11,99±5,54	84,05±14,02	1,45±0,22	0,13±0,04
		<b>p=0,06</b>	<b>p=0,52</b>	<b>p=0,04</b>	<b>p=0,57</b>	<b>p=0,71</b>
<b>GRADO</b>						
G1	2	74,66±50,16	3,97±0,08	63,04±21,01	1,15±0,41	0,06±0,02
G2	6	99,53±25,8	11,78±12,38	71,36±24,48	1,31±0,34	0,14±0,12
G3	23	109,72±48,4	11,33±18,22	71,34±14,12	1,49±0,31	0,13±0,28
		<b>p=0,18</b>	<b>p=0,21</b>	<b>p=0,68</b>	<b>p=0,12</b>	<b>p=0,27</b>

Los valores se expresan en Medianas ± rango intercuartílico. El valor de p corresponde al test U de Mann-Whitney cuando se comparan dos variables y al test de Kruskal-Wallis cuando se comparan >2. Los valores en negrilla alcanzan significación estadística.



**Figura 17:** Comparación de medianas entre los valores de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 entre las categorías tumorales Ta, T1, T2, T3 y T4 (Kruskal-Wallis;  $p=0,02$ ;  $p=0,04$  y  $p=0,06$ , respectivamente para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2).



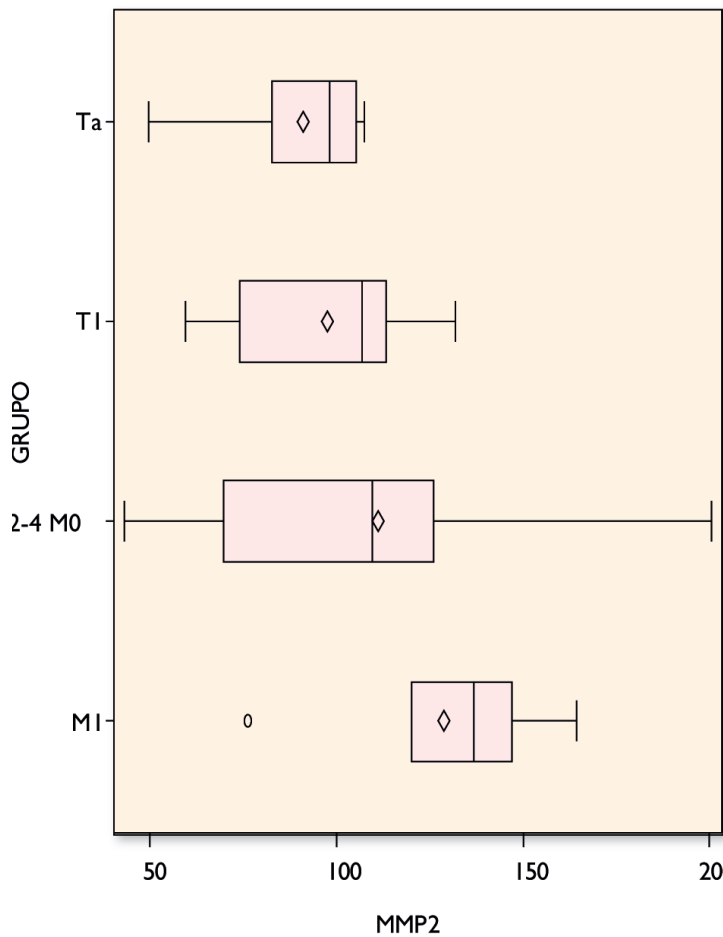
**Figura 18:** Comparación de medianas entre los valores de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 entre las categorías tumorales M0 y M1 (U Mann-Whitney;  $p=0,06$ ;  $p=0,5$  y  $p=0,04$ , respectivamente para MMP-2, MMP-9 y TIMP-2).

Teniendo en cuenta los datos hasta ahora obtenidos, respecto a la capacidad para estadificar desde el punto de vista molecular los pacientes con neoplasia vesical, parece que MMP-2 y MMP-9 discriminan mejor con respecto a la categoría T; mientras que respecto a la capacidad de discernir la presencia de metástasis al diagnóstico, parece que TIMP-2 muestra mayor potencial. Por ello, hemos estudiado la capacidad de los tres marcadores para definir grupos de pacientes en base a criterios que unifican tanto el nivel de infiltración parietal como el riesgo de presentar metástasis. A tal fin, se establecen 4 grupos de enfermedad: i. No

invasiva (Ta); ii. Invasiva mínima (T1, con afectación del tejido conectivo subepitelial exclusivamente); iii. Abiertamente invasiva no metastática (T2-T4 M0, con afectación de la capa muscular propia o mayor pero sin presencia de metástasis); iv. Metastática (M1). Las Tablas X-XII, así como las figuras 19-21 muestran la capacidad de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 para discriminar entre estos grupos de pacientes con cáncer vesical en la serie analizada. No se aprecia diferencia de medianas entre los grupos para MMP-2, lo que confirma su falta de capacidad discriminativa (Tabla X, Figura 19). MMP-9 muestra diferencias, sobre todo en lo que respecta a niveles menores en cáncer no invasivo (Ta). No obstante, la diferencia de medianas no supera el nivel de significación estadística (Tabla XI, Figura 20). Finalmente TIMP-2 muestra diferencias que si alcanzan este nivel ( $p=0,04$ ), sobre todo a expensas de una mediana más elevada en los pacientes con afectación metastática (Tabla XII, Figura 21), tal y como ya había sido detectado al estudiar la distribución según categoría M (Figura 18).

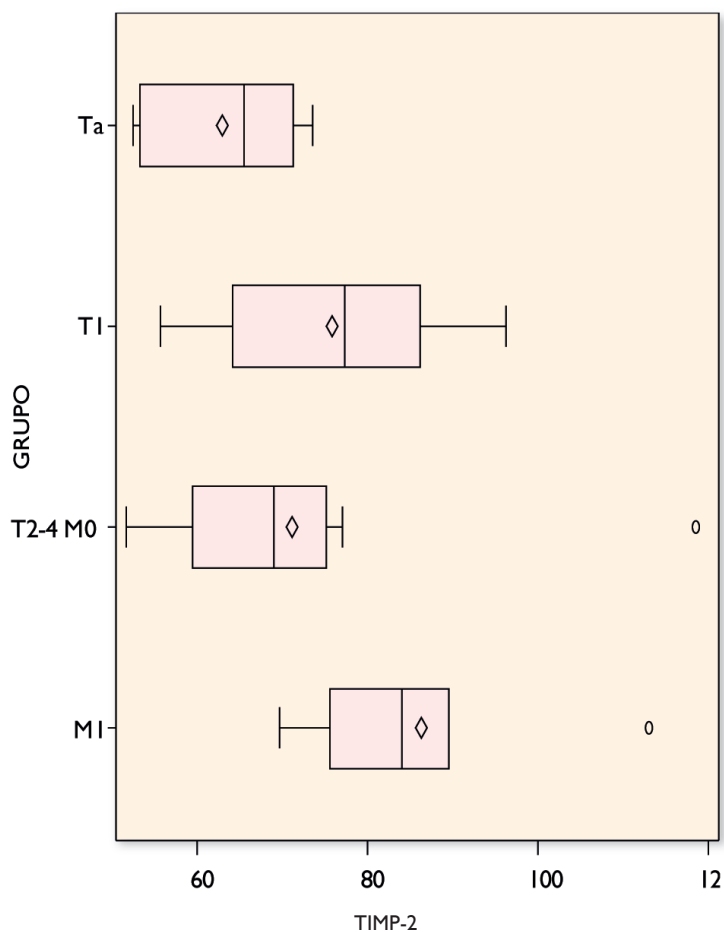
En resumen, los datos obtenidos relativos al estudio de niveles séricos de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y de TIMP-2, con respecto a la segregación de grupos con diferente invasión tumoral (mural y a distancia) no mejoran los que se obtienen cuando se analizan por un lado la categoría T y por otro la categoría M. Los datos obtenidos parecen sugerir que MMP-2 y MMP-9 discriminan mejor los niveles de invasión parietal (T), mientras que TIMP-2 discrimina mejor la existencia o no de afectación metastática (M).

Tabla X. Valores de MMP-2 para cada grupo de enfermedad tumoral							
MMP2		N	MEDIANA	IQR	IC MEDIA 95%		p VALOR
					INF.	SUP.	
GRUPO	Ta	7	98,20	22,62	72,53	109,5	
	T I	8	106,80	39,18	76,16	118,9	
	T2-4 M0	11	109,72	56,31	79,11	143,0	
	MI	5	136,88	27,02	87,27	170,6	
	TOTAL	31	105,37	37,26	92,68	119,2	0,15



**Figura 19:** Comparación de medianas entre los valores de MMP-2 entre grupos de pacientes con cáncer vesical, definidos según nivel de invasión parietal y posibilidad de afectación metastásica (Kruskal-Wallis;  $p=0,15$ )

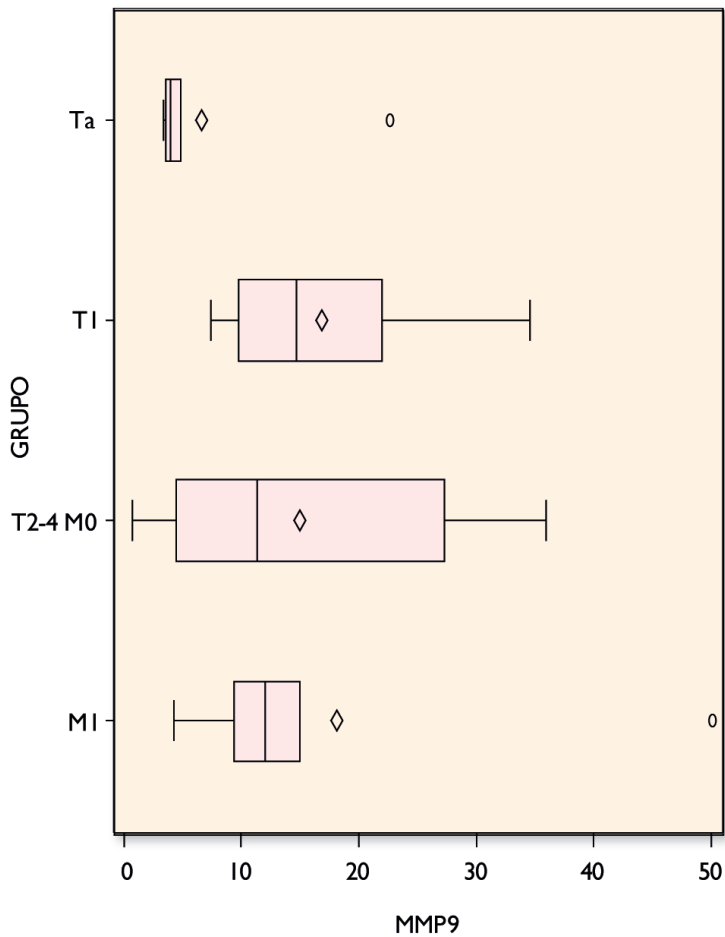
Tabla XI. Valores de MMP-9 para cada grupo de enfermedad tumoral							
MMP9		N	MEDIANA	IQR	IC MEDIA 95%		p VALOR
GRUPO	Ta	7	3,98	1,27	0,07	13,18	
	T1	8	14,70	12,22	9,21	24,47	
	T2-4 M0	11	11,33	22,88	6,86	23,15	
	M1	5	11,99	5,54	-4,58	40,87	
	TOTAL	31	11,33	17,48	9,74	18,45	0,05



**Figura 20:** Comparación de medianas entre los valores de MMP-9 entre grupos de pacientes con cáncer vesical, definidos según nivel de invasión parietal y posibilidad de afectación metastásica (Kruskal-Wallis;  $p=0,05$ ).

**Tabla XII.** Valores de TIMP-2 para cada grupo de enfermedad tumoral

GRUPO	MMP9	N	MEDIANA	IQR	IC MEDIA 95%		p VALOR
					INF.	SUP.	
	Ta	7	65,54	17,99	55,26	70,67	
	T1	8	77,31	22,02	64,45	87,37	
	T2-4 M0	11	69,00	15,66	59,16	83,15	
	M1	5	84,05	14,02	65,63	107,2	
	TOTAL	31	71,34	14,71	67,10	78,89	0,04



**Figura 21:** Comparación de medianas entre los valores de TIMP-2 entre grupos de pacientes con cáncer vesical, definidos según nivel de invasión parietal y posibilidad de afectación metastásica (Kruskal-Wallis;  $p=0,04$ ).

**TABLA XIII.** Estimación de contraste de curvas ROC y Comparación de ABC

Comparación	Estimado	Error Estándar	IC 95%		Chi-x2	Test Z
<b>MMP-9 – TIMP-2</b>	-0,25	0,09	-0,44	-0,06	6,76	0,009
<b>MMP-9 – MMP-9/TIMP-2</b>	0	0,01	-0,02	0,02	0	1
<b>MMP-9/TIMP-2 – TIMP-2</b>	-0,25	0,1	-0,45	-0,05	5,94	<b>0,015</b>



#### **4.5 ANÁLISIS DE EXACTITUD DIAGNÓSTICA Y ESTABLECIMIENTO DE PUNTOS DE CORTE DE NIVELES PROTÉICOS**

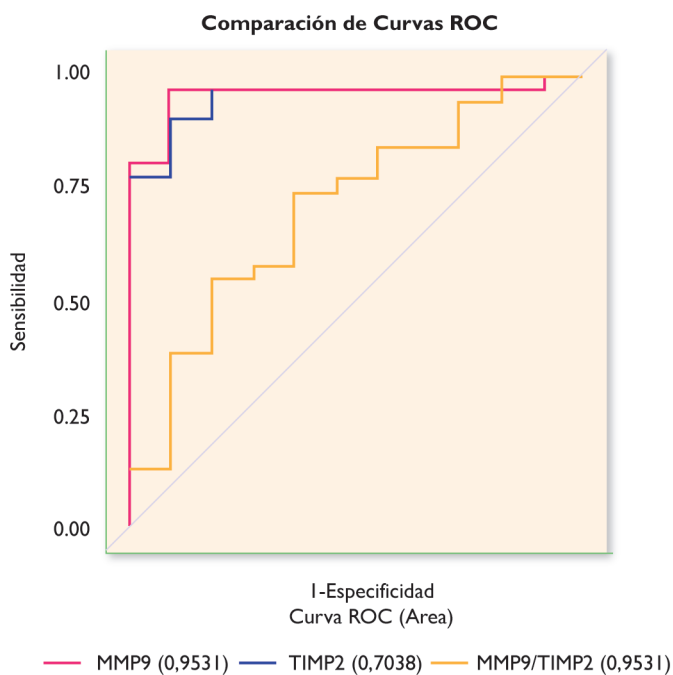
Dado que en el apartado 4.3. se ha confirmado la capacidad que los niveles proteicos de MMP-9 y TIMP-2 tienen para diferenciar entre pacientes con cáncer e individuos sanos, así como el cociente MMP-9/TIMP-2 (Tabla VII). Tiene sentido plantear un análisis de exactitud diagnóstica con estos marcadores séricos.

El análisis mediante curvas receptor operador (ROC) reveló que tanto MMP-9 (ABC=0,95; IC 95% 0,89-1,0) como el cociente MMP-9/TIMP-2 (ABC=0,95; IC 95% 0,88-1,0) discriminan pacientes con cáncer y controles, con equivalente exactitud diagnóstica. Ahora bien, la capacidad de TIMP-2 para establecer dicha discriminación fue notablemente menor (ABC=0,7; IC 95% 0,52-0,89) (Figura 22).

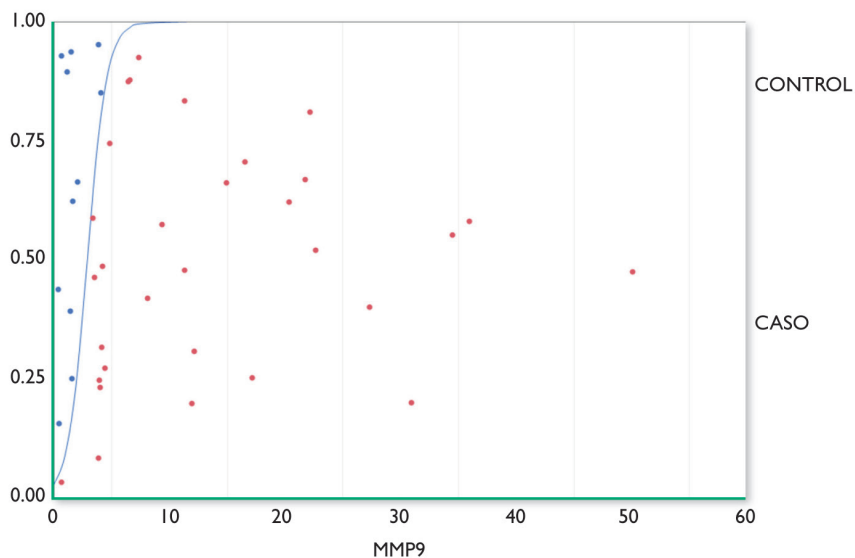
La diferencia entre áreas bajo la curva (ABC) para MMP-9 y TIMP-2 fue estadísticamente significativa (Z test;  $p=0,009$ ); así como entre MMP-9/TIMP-2 y TIMP-2 ( $p=0,015$ ). No se estableció ninguna diferencia entre el ABC de MMP-9 y de TIMP-2 ( $p=1$ ) (Tabla XIII).

Esto significa que tiene más sentido establecer puntos de corte para su eventual utilidad clínica en el diagnóstico de cáncer vesical, para las determinaciones séricas de MMP-9 o de MMP-9/TIMP-2, que para la determinación de TIMP-2.

Por un lado se ha llevado a cabo el cálculo de punto de corte para detectar el valor de máxima sensibilidad y máxima especificidad de MMP-9 en la discriminación entre caso y control, lo que conlleva una gran implicación diagnóstica en la detección del cáncer vesical empleando este marcador de carácter no invasivo y de forma automatizada. La distribución gráfica de valores de MMP-9 en un gráfico logístico se expresa en la Figura 23.



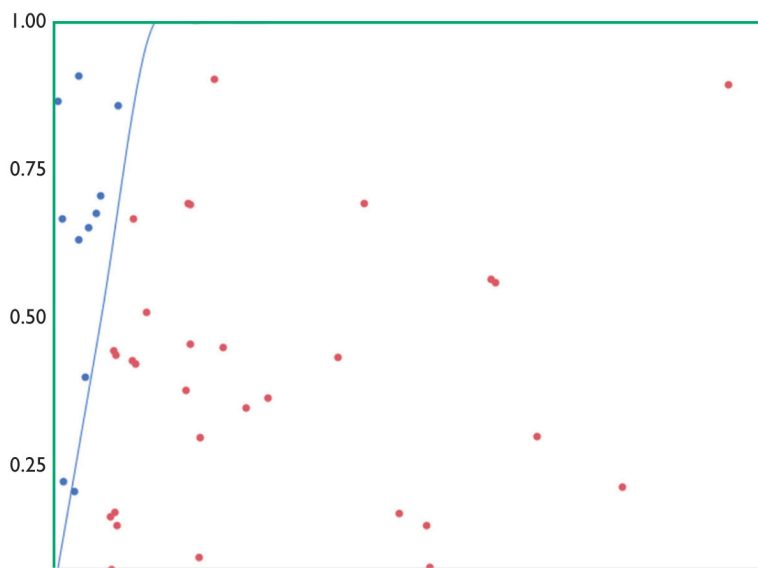
**Figura 22:** Curvas ROC que evalúan la exactitud para el diagnóstico de cáncer vesical de MMP-9, TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2. Se especifica el Area Bajo la Curva (ABC) para cada marcador.



**Figura 23:** Distribución de valores de MMP-9 para el cálculo de un punto de corte que permita segregar casos de controles

El punto de corte para MMP-9 de 3,93 ng/mL proporcionó discriminación entre pacientes con cáncer y control, con una sensibilidad y especificidad para predecir la ocurrencia de cáncer en esta serie de 90% y 81%, respectivamente (Tabla XIV).

Por otro lado se ha establecido a cabo el cálculo de punto de corte para detectar el valor de máxima sensibilidad y máxima especificidad de MMP-9/TIMP-2 para el diagnóstico no invasivo del cáncer vesical empleando este cociente. La distribución gráfica de valores de MMP-9/TIMP-2 en gráfico logístico se expresa en la figura 24. No obstante, debemos ser conscientes de que para llevar a cabo el cociente MMP-9/TIMP-2 se necesita practicar dos determinaciones, hecho que supone una desventaja, al menos desde el punto de vista económico, en términos de discriminación diagnóstica.



**Figura 24:** Distribución de valores del cociente MMP-9/TIMP-2 para el cálculo de un punto de corte que permita segregar casos de controles.

El punto de corte óptimo para MMP-9/TIMP-2 fue 0,053. Con este valor se consigue una sensibilidad de 97% y especificidad de 88% (Tabla XV). Estos parámetros son levemente superiores a los detectados para el punto de corte de MMP-9. No obstante, para establecer el cociente MMP-9/TIMP-2 se necesitan dos determinaciones y el ABC respecto a MMP-9 es estrictamente equivalente (Tabla XIII).

#### 4.5. EVALUACIÓN DE PRONÓSTICO SEGÚN NIVELES PROTÉICOS

Todos los pacientes con carcinoma vesical (n=31) fueron intervenidos en el Hospital Universitario de Getafe, según *lex artis*. Los pacientes con tumores no músculo-invasivos (Ta o T1, independientemente del grado) fueron tratados inicialmente con resección transuretral de vejiga (RTU vesical) y recibieron tratamiento adyuvante según el grupo de riesgo en el que se encontraran (criterios EORTC), con el bacilo Calmette-Guérin (BCG) o con Mitomicina-C (MMC) endovesical. En los pacientes con tumores músculo invasivos (T2-T4; n=16) se consideró la posibilidad de practicar también cistectomía. En 5 casos no se llevó a cabo la cistectomía por tratarse de enfermedad metastásica y en 1 paciente por elevada edad y riesgo preoperatorio. En resumen, se llevó a cabo cistectomía en 10 pacientes. Los pacientes con enfermedad metastásica fueron tratados con quimioterapia sistémica a base de cisplatino y gemcitabina. El paciente con enfermedad músculo-invasiva no metastática fue tratado con doble resección transuretral. Todos los pacientes recibieron RTU-vesical del tumor primario, y además a 10 se les realizó cistectomía radical, en el periodo comprendido entre agosto de 2004 y marzo de 2006. Todos los pacientes han sido evaluados hasta el 15 de julio de 2013 (fecha de último seguimiento). Los 11 controles sanos también han sido seguidos para notificar el eventual desarrollo de alguna enfermedad maligna o proceso reseñable, sin evidenciar patología alguna durante este mismo periodo.

Se ha realizado un estudio de supervivencia en tres niveles. Por un lado se ha estudiado la supervivencia libre de enfermedad (supervivencia cáncer

específica) para todos los pacientes con cáncer vesical ( $n=31$ ). Por otro lado, se ha analizado también la supervivencia libre de recurrencia (SLR) y la supervivencia libre de progresión (SLP) en los pacientes con enfermedad no músculo invasiva al diagnóstico (tumores Ta-T1;  $n=15$ ). Evidentemente el estudio de SLR y de SLP debe tomarse con gran cautela porque la muestra de pacientes es insuficiente; no obstante, presentamos los datos obtenidos porque se muestran algunas tendencias de interés. Ahora bien, el estudio de supervivencia se centrará en la supervivencia cáncer específica para todo tipo de pacientes con cáncer urotelial de la vejiga urinaria.

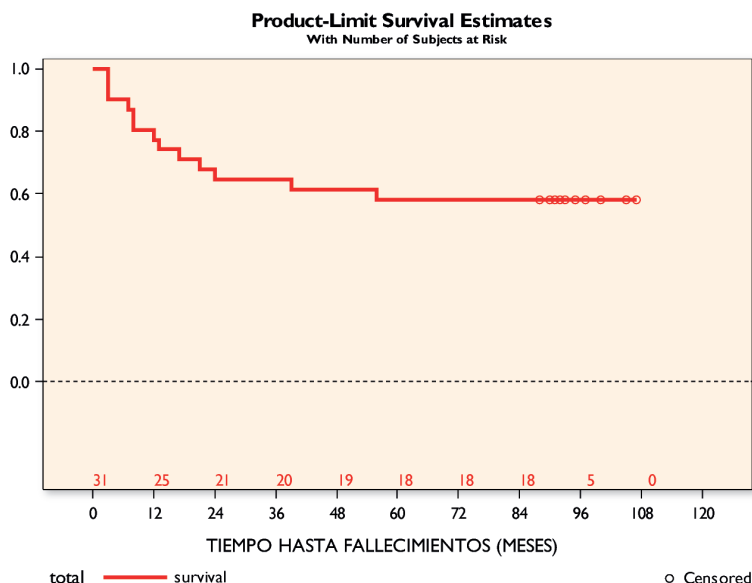
#### 4.5.1. SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA

La curva Kaplan-Meier que refleja la supervivencia cáncer específica para la serie total de pacientes con cáncer se expresa en la Figura 25. El seguimiento medio de los pacientes fue  $61,6 \pm 40,4$  (3-107) meses. Es importante conocer la muestra global para poder estratificar apropiadamente la supervivencia según los diferentes marcadores. Para poder estudiar el valor pronóstico de cada uno de los marcadores analizados es necesario realizar estudio de supervivencia estratificando la muestra según los niveles de expresión proteica de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2; así como de los respectivos cocientes MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2. Como no existen estudios previos no disponemos de puntos de corte conocidos para establecer diferentes grupos de pronóstico. Por ello, se ha comprobado si los cortes que determinan los valores Q1, Q2 (mediana) y Q3 de cada muestra tienen sentido a la hora de discriminar diferentes grupos de pacientes con eventual mejor o peor pronóstico.

En la Tabla XVI se muestran los puntos que definen los intervalos Q1, Q2 y Q3 en los pacientes con cáncer, y los valores del test Log-rank obtenidos al comparar la supervivencia cáncer específica de los pacientes segregados por dichos puntos de corte. El valor Q3 es aquel que mejor discrimina para todas las variables analizadas. No obstante, las diferencias detectadas en términos de supervivencia alcanzan significación estadística para MMP-2, MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2.

Las diferencias detectadas empleando los valores de MMP-9 se encuentran muy próximas a la significación (Log-rank,  $p=0,08$ ; Wilcoxon,  $p=0,04$ ). TIMP-2 como valor aislado no discrimina grupos de diferente pronóstico.

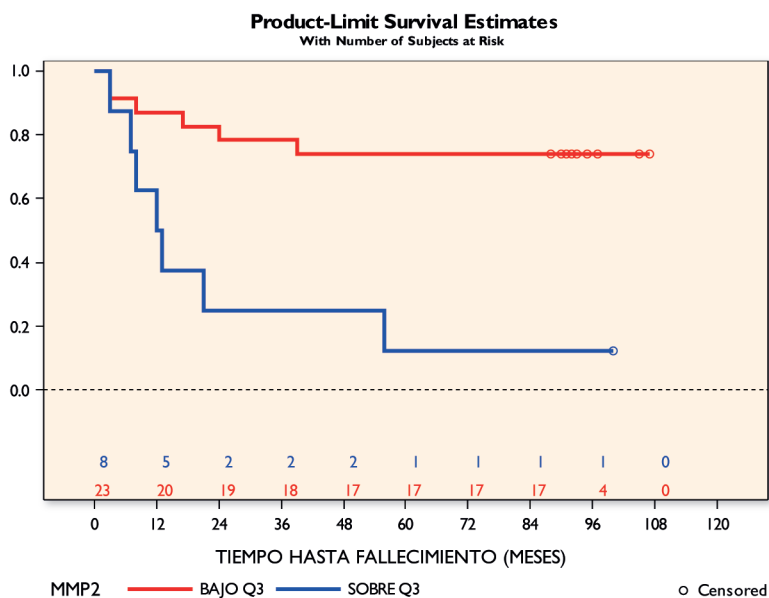
Un valor de MMP-2 de 120 ng/mL discrimina grupos de diferente pronóstico en pacientes con cáncer (Figura 27). De hecho, a 5 años fallecen a causa de la enfermedad el 26% de los pacientes con valores  $<120$  ng/mL, mientras que el 87,5% de los pacientes con valores  $>120$  ng/mL fallecen (Tabla XVII, Figura 26). El test log-rank muestra una  $p=0,007$ . Este hecho implica que los valores séricos de MMP-2 teniendo en cuenta este punto de corte pueden emplearse para discriminar pacientes con diferente pronóstico en un análisis univariante.



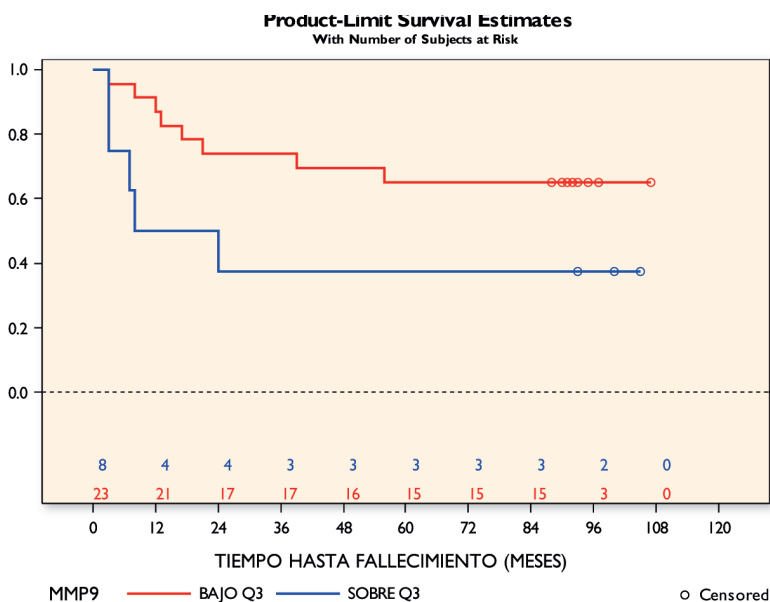
**Figura 25:** Supervivencia cáncer específica para pacientes con cáncer vesical

**TABLA XIV. Punto óptimo de MMP-9 sérico para el diagnóstico de neoplasia vesical**

MMP-9	Probabilidad	I-Especificidad	Sensibilidad	Sensibilidad- (I-Especificidad)	VP	VN	FP	FN
		0	0	0	0	11	0	31
16,6	1	0	0,3548	0,3548	11	11	0	20
14,94	1	0	0,3871	0,3871	12	11	0	19
12,18	1	0	0,4194	0,4194	13	11	0	18
11,99	1	0	0,4516	0,4516	14	11	0	17
11,38	1	0	0,4839	0,4839	15	11	0	16
11,33	1	0	0,5161	0,5161	16	11	0	15
9,4	0,9996	0	0,5484	0,5484	17	11	0	14
8,13	0,9981	0	0,5806	0,5806	18	11	0	13
7,37	0,9952	0	0,6129	0,6129	19	11	0	12
6,61	0,9882	0	0,6452	0,6452	20	11	0	11
6,5	0,9866	0	0,6774	0,6774	21	11	0	10
4,84	0,9108	0	0,7097	0,7097	22	11	0	9
4,45	0,8652	0	0,7419	0,7419	23	11	0	8
4,28	0,8398	0	0,7742	0,7742	24	11	0	7
4,15	0,8179	0	0,8065	0,8065	25	11	0	6
4,1	0,8088	0,0909	0,8065	0,7155	25	10	1	6
4,01	0,7917	0,0909	0,8387	0,7478	26	10	1	5
3,98	0,7858	0,0909	0,871	0,7801	27	10	1	4
3,93	0,7756	0,0909	0,9032	0,8123	28	10	1	3
3,91	0,7714	0,1818	0,9032	0,7214	28	9	2	3
3,57	0,6925	0,1818	0,9355	0,7537	29	9	2	2
3,39	0,6451	0,1818	0,9677	0,7859	30	9	2	1
2,12	0,2861	0,2727	0,9677	0,695	30	8	3	1
1,64	0,1846	0,3636	0,9677	0,6041	30	7	4	1
1,58	0,1741	0,4545	0,9677	0,5132	30	6	5	1
1,54	0,1673	0,5455	0,9677	0,4223	30	5	6	1
1,45	0,1529	0,6364	0,9677	0,3314	30	4	7	1
1,19	0,117	0,7273	0,9677	0,2405	30	3	8	1
0,73	0,0712	0,8182	0,9677	0,1496	30	2	9	1
0,72	0,0704	0,8182	1	0,1818	31	2	9	0
0,49	0,0545	0,9091	1	0,0909	31	1	10	0
0,41	0,0498	1	1	0	31	0	11	0
0,41	0,0498	1	1	0	31	0	11	0



**Figura 26:** Supervivencia cáncer específica según niveles séricos de MMP-2



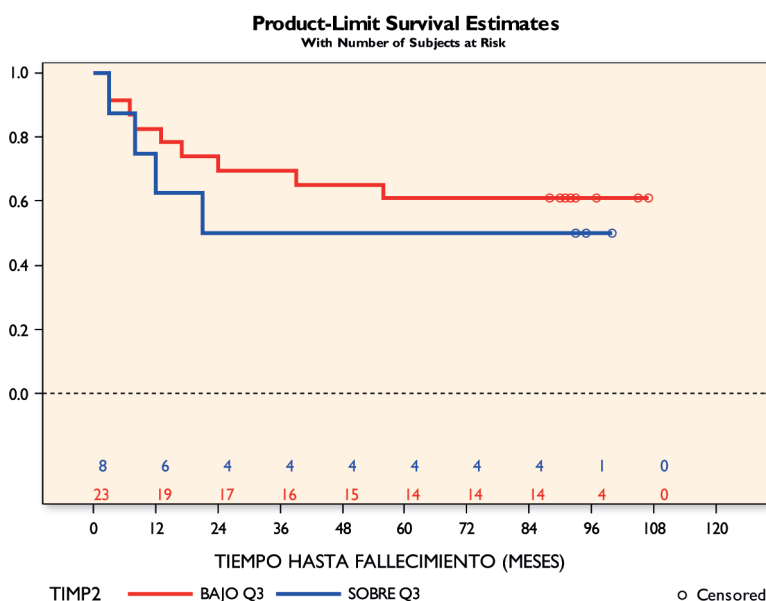
**Figura 27:** Supervivencia cáncer específica según niveles séricos de MMP-9.



**TABLA XV.** Punto óptimo de MMP-9/TIMP-2 para el diagnóstico de neoplasia vesical

MMP-9/ TIMP-2	Probabilidad	1-Especificidad	Sensibilidad	Sensibilidad-(1- Especificidad)	VP	VN	FP	FN
		0	0	0	0	11	0	31
0,261	1	0	0,3226	0,3226	10	11	0	21
0,197	1	0	0,3548	0,3548	11	11	0	20
0,177	1	0	0,3871	0,3871	12	11	0	19
0,156	0,9999	0	0,4194	0,4194	13	11	0	18
0,147	0,9998	0	0,4516	0,4516	14	11	0	17
0,134	0,9995	0	0,4839	0,4839	15	11	0	16
0,133	0,9995	0	0,5161	0,5161	16	11	0	15
0,126	0,9991	0	0,5484	0,5484	17	11	0	14
0,125	0,999	0	0,5806	0,5806	18	11	0	13
0,124	0,9989	0	0,6129	0,6129	19	11	0	12
0,122	0,9987	0	0,6452	0,6452	20	11	0	11
0,086	0,9733	0	0,6774	0,6774	21	11	0	10
0,076	0,9387	0	0,7097	0,7097	22	11	0	9
0,074	0,9297	0	0,7419	0,7419	23	11	0	8
0,073	0,9237	0	0,7742	0,7742	24	11	0	7
0,059	0,7906	0,0909	0,7742	0,6833	24	10	1	7
0,059	0,7818	0,0909	0,8065	0,7155	25	10	1	6
0,057	0,7611	0,0909	0,8387	0,7478	26	10	1	5
0,056	0,743	0,0909	0,871	0,7801	27	10	1	4
0,055	0,7287	0,0909	0,9032	0,8123	28	10	1	3
0,054	0,7063	0,0909	0,9355	0,8446	29	10	1	2
0,053	0,6879	0,0909	0,9677	0,8768	30	10	1	1
0,043	0,4943	0,1818	0,9677	0,7859	30	9	2	1
0,040	0,4183	0,2727	0,9677	0,695	30	8	3	1
0,033	0,2833	0,3636	0,9677	0,6041	30	7	4	1
0,030	0,2367	0,4545	0,9677	0,5132	30	6	5	1
0,024	0,158	0,5455	0,9677	0,4223	30	5	6	1
0,020	0,1178	0,7273	0,9677	0,2405	30	3	8	1
0,010	0,0549	0,8182	0,9677	0,1496	30	2	9	1
0,008	0,0473	0,9091	0,9677	0,0587	30	1	10	1
0,006	0,0384	0,9091	1	0,0909	31	1	10	0
0,005	0,0367	1	1	0	31	0	11	0

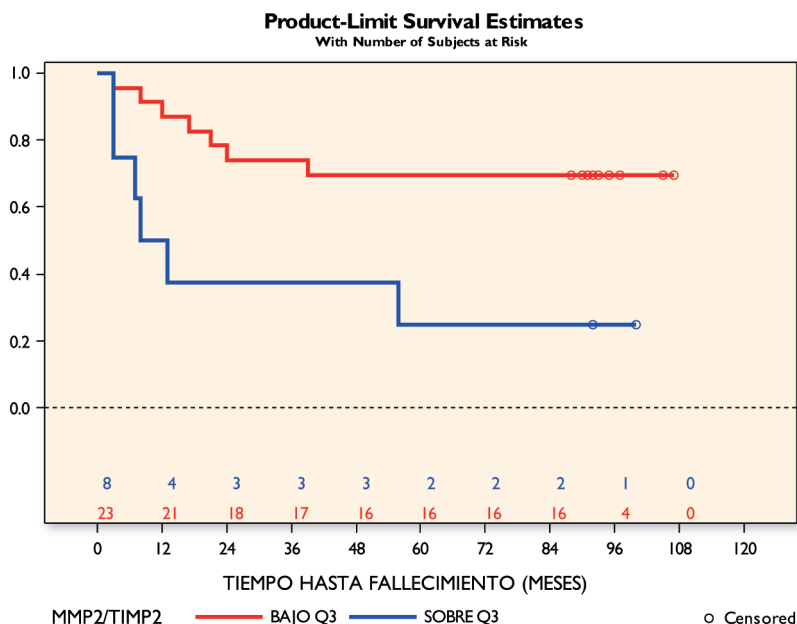
Un valor de TIMP-2 de 77,7 ng/mL no discrimina grupos de diferente pronóstico en pacientes con cáncer (Figura 28). De hecho, la proporción de pacientes que fallecen por cáncer es similar para sujetos con valores de TIMP-2 por debajo o por encima de ese punto de corte; 39,1% vs 50% a 5 años (Tabla XIX, Figura 28). El test log-rank muestra una  $p=0,5$ . Este hecho implica que, según los datos obtenidos, los valores séricos de TIMP-2 no pueden utilizarse para discriminar el pronóstico de pacientes con cáncer vesical.



**Figura 28:** Supervivencia cáncer específica según niveles séricos de TIMP-2.

El cociente MMP-2/TIMP-2 de 1,6 es útil para discriminar grupos de diferente pronóstico en pacientes con cáncer (Figura 29). De hecho, a 5 años fallecen a causa de la enfermedad el 30,4% de los pacientes con valores  $<1,6$  y el 75% de los pacientes que muestran un valor  $>1,6$  (Tabla XX, Figura 29). El test log-rank muestra una  $p=0,008$ . Este hecho implica que la proporción relativa entre

los valores séricos de MMP-2 y de TIMP-2, teniendo en cuenta este punto de corte, pueden emplearse para discriminar grupos de pronóstico diferente en los pacientes con cáncer de vejiga.



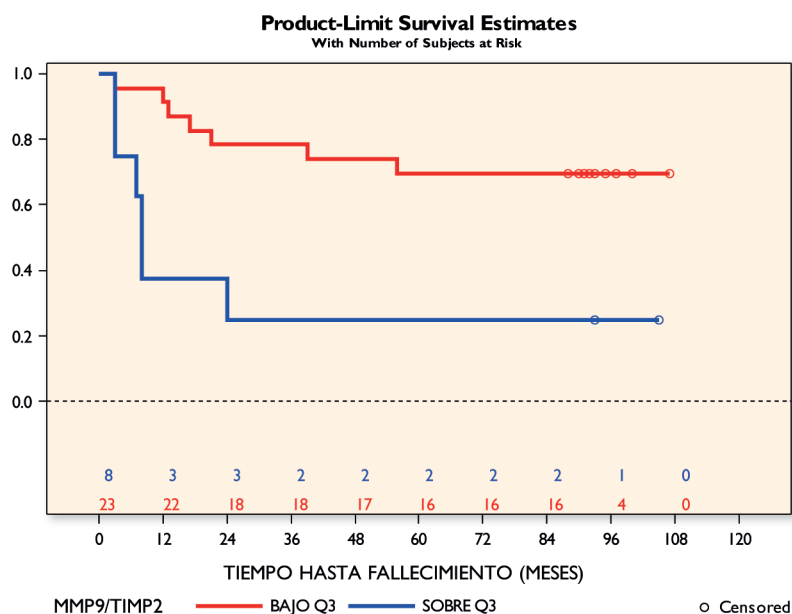
**Figura 29:** Supervivencia cáncer específica según el cociente MMP-2/TIMP-2.

El cociente MMP-9/TIMP-2 de 0,3 es útil para discriminar grupos de diferente pronóstico en pacientes con cáncer (Figura 30). De hecho, a 5 años fallecen a causa de la enfermedad el 30,4% de los pacientes con valores  $<0,3$  y el 75% de los pacientes que muestran un valor  $>0,3$  (Tabla XXI, Figura 30). El test log-rank muestra una  $p=0,004$ . Este hecho implica que la proporción relativa entre los valores séricos de MMP-9 y de TIMP-2, teniendo en cuenta este punto de corte, pueden emplearse también para discriminar grupos de pronóstico diferente en los pacientes con cáncer de vejiga.

**TABLA XVI:** Comparativos de supervivencia (log-rank) según diferentes puntos de corte

		Valor Q1	Valor Q2	Valor Q3
<b>MMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	82,8	105,37	120
	<b>p (Log-rank)</b>	0,1	0,3	<b>0,007 *</b>
<b>MMP-9</b>	<b>Punto de Corte</b>	4,3	11,33	21,8
	<b>p (Log-rank)</b>	0,1	0,06	<b>0,08</b>
<b>TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	63	71,34	77,7
	<b>p (Log-rank)</b>	0,9	0,8	<b>0,5</b>
<b>MMP-2/TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	1,2	1,45	1,6
	<b>p (Log-rank)</b>	0,02	0,29	<b>0,008 *</b>
<b>MMP-9/TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	0,1	0,13	0,3
	<b>p (Log-rank)</b>	0,4	0,06	<b>0,004 *</b>

Los valores de p en negrilla son los que mejor discriminan (Q3 en todos los casos). Los valores marcados con \* muestran diferencias de significación estadística

**Figura 30:** Supervivencia cáncer específica según el cociente MMP-9/TIMP-2.

**TABLA XVII:** Niveles de MMP-2 y probabilidad de fallecer por cáncer.

MMP-2	Tiempo	Probabilidad	IC 95% Superior	IC 95% Inferior
< 120 ng/mL	12 meses	0,13	0,352	0,044
	24 meses	0,217	0,446	0,097
	48 meses	0,26	0,491	0,127
>120 ng/mL	12 meses	0,5	0,848	0,225
	24 meses	0,75	0,963	0,442
	60 meses	0,875	0,993	0,577

**TABLA XVIII:** Niveles de MMP-9 y probabilidad de fallecer por cáncer.

MMP-9	Tiempo	Probabilidad	IC 95% Superior	IC 95% Inferior
< 21,8 ng/mL	12 meses	0,13	0,352	0,044
	24 meses	0,261	0,491	0,127
	48 meses	0,304	0,534	0,158
	60 meses	0,348	0,577	0,192
>21,8 ng/mL	12 meses	0,5	0,848	0,225
	24 meses	0,625	0,913	0,326

En resumen, las implicaciones en la evaluación de pronóstico para pacientes con cáncer son múltiples en lo que respecta a la posibilidad de emplear los niveles séricos de gelatinasas y TIMP-2, bien solos o en combinación, para la predicción de pronóstico. No obstante, se necesitan estudios a mayor escala, deseablemente multicéntricos, y con mayor número de pacientes para poder establecer el papel de estos nuevos marcadores en la predicción de pronóstico, empleando una determinación analítica en sangre mediante ELISA. Será deseable establecer estudios similares con mayor

**TABLA XIX:** Niveles de TIMP-2 y probabilidad de fallecer por cáncer.

TIMP-2	Tiempo	Probabilidad	IC 95% Superior	IC 95% Inferior
< 77,7 ng/mL	12 meses	0,174	0,399	0,069
	24 meses	0,304	0,534	0,158
	48 meses	0,348	0,576	0,192
	60 meses	0,391	0,617	0,226
>77,7 ng/mL	12 meses	0,375	0,771	0,139
	24 meses	0,5	0,993	0,577

**TABLA XX:** Niveles de MMP-2/TIMP-2 y probabilidad de fallecer por cáncer.

MMP-2/TIMP-2	Tiempo	Probabilidad	IC 95% Superior	IC 95% Inferior
< 1,6	12 meses	0,13	0,352	0,044
	24 meses	0,261	0,491	0,127
	48 meses	0,304	0,534	0,158
>1,6	12 meses	0,5	0,848	0,225
	24 meses	0,625	0,913	0,326
	60 meses	0,75	0,963	0,442

número de pacientes para poder practicar un análisis multivariante y definir en qué medida esta capacidad para predecir pronóstico es dependiente o no de otros factores predictivos de pronóstico convencionales, como el estadio clínico o el grado tumoral. La serie de este trabajo no nos permite llevar a cabo un análisis multivariante para balancear apropiadamente el peso de estos hallazgos en la predicción de pronóstico de nuestros pacientes. Ahora bien, puede defenderse el hecho de que los niveles séricos de MMP-2 y los cocientes entre los niveles séricos de

MMP-2 y TIMP-2, y de MMP-9 y TIMP-2 sean muy posiblemente elementos predictivos de pronóstico en pacientes con cáncer vesical. Recapitulando, para establecer el diagnóstico de cáncer vesical; es decir, para discriminar entre pacientes con cáncer y controles sanos MMP-9 y MMP-9/TIMP-2 son las variables que ofrecen mejores perspectivas (Tablas VII, XIV y XV). Ahora bien, para predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer vesical son MMP-2, MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2 las variables más prometedoras. En resumen, previamente se señaló que en términos de diagnóstico, posiblemente no tendría gran sentido establecer MMP-9 y TIMP-2 (y realizar entonces el cociente), puesto que este hecho supone multiplicar el coste del marcador diagnóstico.

<b>TABLA XXI: Niveles de MMP-9/TIMP-2 y probabilidad de fallecer por cáncer.</b>				
<b>MMP-9/TIMP-2</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>IC 95% Superior</b>	<b>IC 95% Inferior</b>
< 0,3	12 meses	0,087	0,305	0,022
	24 meses	0,217	0,446	0,097
	48 meses	0,261	0,491	0,127
	60 meses	0,304	0,534	0,158
> 0,3	12 meses	0,625	0,913	0,326
	24 meses	0,75	0,963	0,442

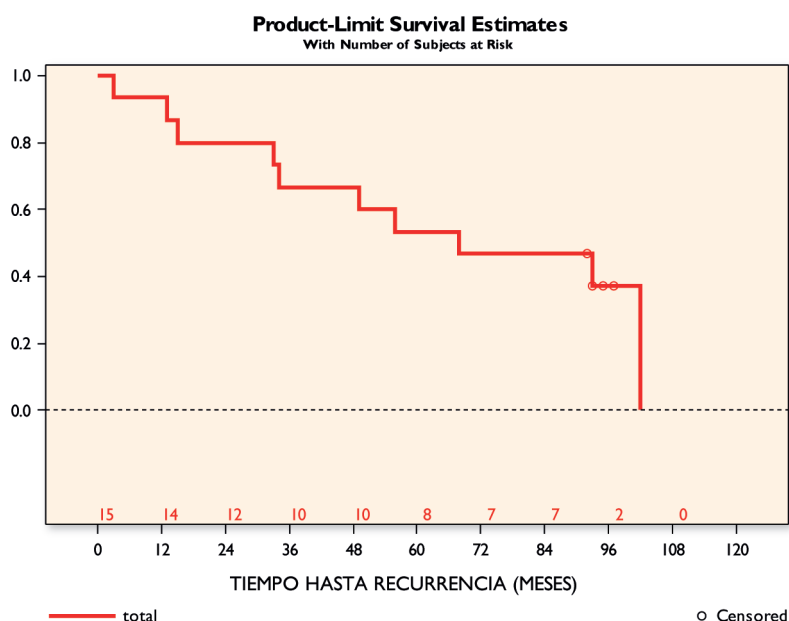
Ahora, teniendo también en cuenta la información relativa al pronóstico, determinar MMP-9 y TIMP-2 de forma independiente para poder establecer su cociente es la única forma de poder llevar a cabo un diagnóstico y una evaluación de pronóstico altamente efectivas simultáneamente.

Este hecho permite plantear el valor añadido de determinar TIMP-2 asociado a MMP-9 sobre la determinación de MMP-9 exclusivamente. Desde luego, será necesario llevar a cabo estudios de coste efectividad que tengan en cuenta las

implicaciones económicas aquí manifestadas acerca de si la doble determinación es más necesaria que la determinación simple.

#### 4.6.2. RECURRENCIA Y PROGRESIÓN PARA TUMORES NO MÚSCULO-INVASIVOS

Con la serie analizada no podemos garantizar datos fiables acerca de la recurrencia tumoral y de la progresión tumoral en pacientes con enfermedad no músculo invasiva, puesto que la muestra queda limitada a simplemente 15 pacientes. La curva Kaplan-Meier que refleja la supervivencia libre de recurrencia (SLR) para pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo al diagnóstico se expresa en la Figura 31. El seguimiento medio de estos pacientes ( $n=15$ ) fue  $87,1 \pm 23,3$  (24-107) meses. Es importante conocer la muestra global para poder estratificar apropiadamente la supervivencia según los diferentes marcadores.



**Figura 31:** Supervivencia libre de recurrencia para pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo.



Para poder estudiar el valor pronóstico de cada uno de los marcadores analizados es necesario realizar estudio de supervivencia estratificando la muestra según los niveles de expresión proteica de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2; así como de los respectivos cocientes MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2. Como no existen estudios previos no disponemos de puntos de corte conocidos para establecer diferentes grupos de pronóstico. Por ello, se ha comprobado si los cortes que determinan los valores Q1, Q2 (mediana) y Q3 de cada muestra tienen sentido a la hora de discriminar diferentes grupos de pacientes con eventual mejor o peor pronóstico.

En la Tabla XXII se muestran los puntos que definen los intervalos Q1, Q2 y Q3 en los pacientes con cáncer no músculo-invasivo (Ta o T1), y los valores del test Log-rank obtenidos al comparar la supervivencia libre de recurrencia de los pacientes segregados por dichos puntos de corte.

<b>TABLA XXII:</b> Comparativos de supervivencia libre de recurrencia (log-rank) según diferentes puntos de corte				
		Valor Q1	Valor Q2	Valor Q3
<b>MMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	82,75	99,74	108,55
	<b>p (Log-rank)</b>	<b>0,02 *</b>	<b>0,06</b>	0,5
<b>MMP-9</b>	<b>Punto de Corte</b>	3,98	8,13	21,76
	<b>p (Log-rank)</b>	0,43	0,22	0,25
<b>TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	58,66	65,8	77,7
	<b>p (Log-rank)</b>	0,91	0,23	0,4
<b>MMP-2/TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	1,12	1,35	1,5
	<b>p (Log-rank)</b>	<b>0,02 *</b>	0,46	0,16
<b>MMP-9/TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	0,07	0,12	0,29
	<b>p (Log-rank)</b>	0,43	0,22	0,49

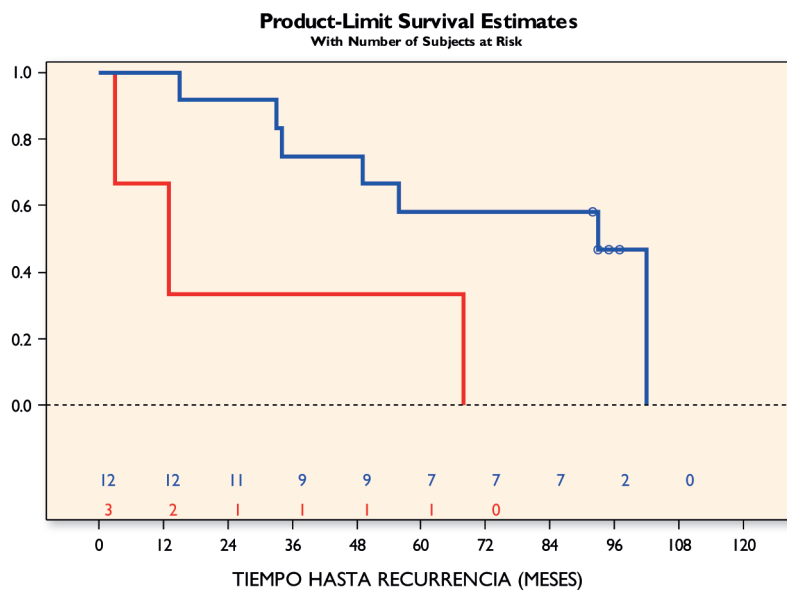
Los valores de p en negrita son los que mejor discriminan (Q1 o Q2). Los valores marcados con \* muestran diferencias de significación estadística

Los valores Q1 de MMP-2 y Q1 de MMP-2/TIMP-2 son los que mejor discriminan SLR entre las variables analizadas, alcanzando significación estadística

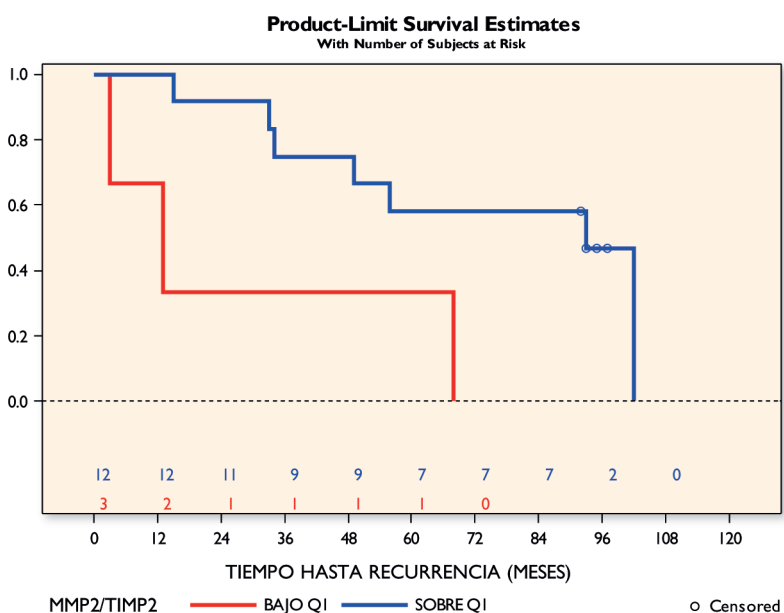
(Log-rank,  $p=0,02$ ). El resto de comparaciones no alcanzan valores estadísticamente significativos. Un valor sérico de MMP-2 de 82,75 ng/mL se presenta como de utilidad para discriminar grupos con diferente riesgo de recurrencia tumoral en pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo (Figura 26). De hecho, a 5 años presentan recurrencia el 66,7% de los pacientes con MMP-2 <82,75 ng/mL frente al 41,7% de los que presentan MMP-2 >82,75 ng/mL (Tabla XXIII, Figura 32). Igualmente, un valor sérico de MMP-2/TIMP-2 de 1,12 también resulta útil para discriminar grupos con diferente riesgo de recurrencia en pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo (Figura 33). A 5 años presentan recurrencia el 66,7% de los pacientes con MMP-2/TIMP-2 <1,12 frente al 41,7% de los que presentan MMP-2/TIMP-2 >1,12 (Tabla XXIV, Figura 33). La curva Kaplan-Meier que refleja la supervivencia libre de progresión (SLP) a enfermedad músculo-infiltrante para pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo al diagnóstico se expresa en la Figura 34. El seguimiento medio de estos pacientes ( $n=15$ ) fue  $87,1 \pm 23,3$  (24-107) meses. Es importante conocer la muestra global para poder estratificar apropiadamente la supervivencia según los diferentes marcadores. Los puntos que definen los intervalos Q1, Q2 y Q3 en los pacientes con cáncer no músculo-invasivo (Ta o T1) son los mismos que los señalados en la Tabla XXII, pero los valores del test de log-rank para SLP varían con esos puntos de corte y se expresan en la Tabla XXV.

**TABLA XXIII:** MMP-2 y probabilidad de recurrencia de cáncer no músculo-invasivo.

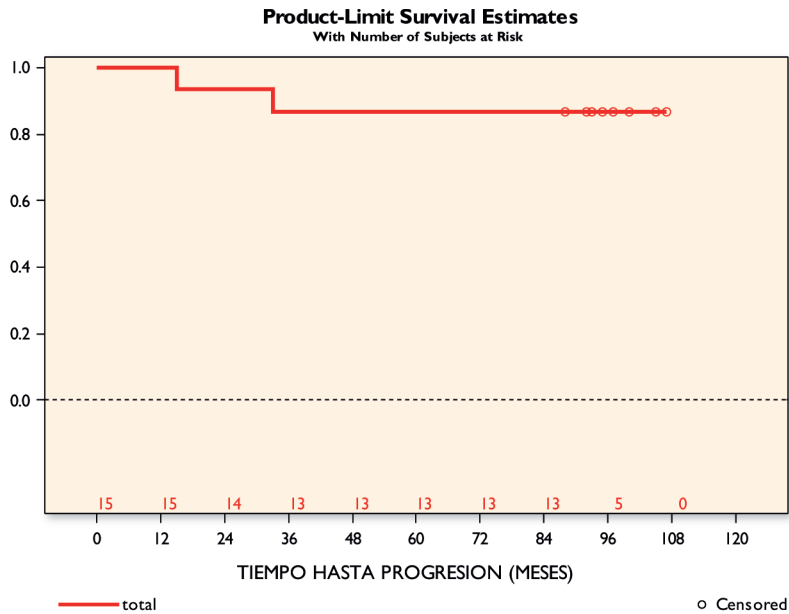
MMP-2	Tiempo	Probabilidad	IC 95% Superior	IC 95% Inferior
< 82,75 ng/mL	12 meses	0,333	0,946	0,055
	24 meses	0,667	0,991	0,226
> 82,75 ng/mL	24 meses	0,083	0,461	0,012
	36 meses	0,25	0,592	0,882



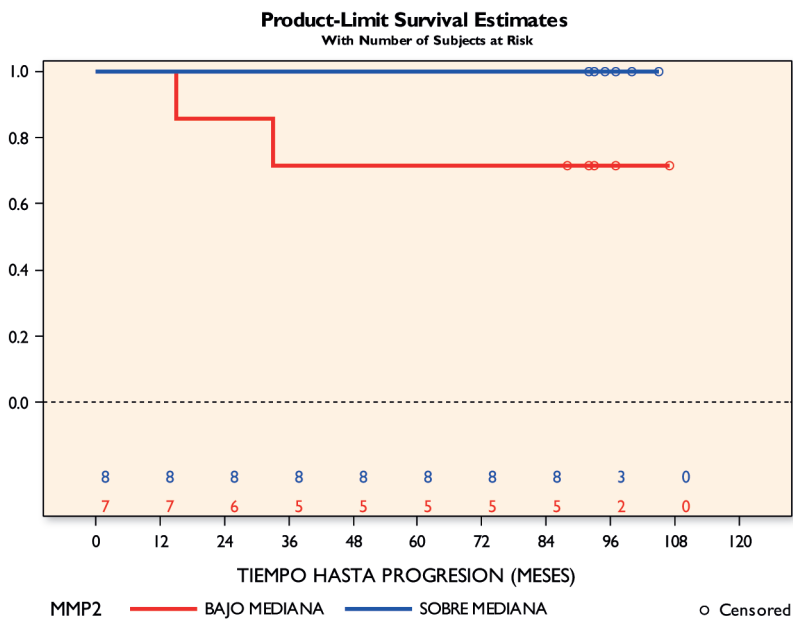
**Figura 32:** Supervivencia libre de recurrencia según MMP-2.



**Figura 33:** Supervivencia libre de recurrencia según MMP-2/TIMP-2.



**Figura 34:** Supervivencia libre de progresión para pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo.



**Figura 35:** Supervivencia libre de progresión según MMP-2.

**TABLA XXIV:** MMP-2/TIMP-2 y probabilidad de recurrencia de cáncer no músculo-invasivo.

MMP-2/TIMP-2	Tiempo	Probabilidad	IC 95% Superior	IC 95% Inferior
<1,12	12 meses	0,333	0,946	0,055
	24 meses	0,667	0,991	0,226
>1,12	24 meses	0,083	0,461	0,012
	36 meses	0,25	0,592	0,882
	60 meses	0,417	0,73	0,199
	96 meses	0,533	0,832	0,278

**TABLA XXV:** Comparativos de supervivencia libre de progresión (log-rank) según diferentes puntos de corte

		Valor Q1	Valor Q2	Valor Q3
<b>MMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	82,75	99,74	108,55
	<b>p (Log-rank)</b>	0,47	0,12	0,38
<b>MMP-9</b>	<b>Punto de Corte</b>	3,98	8,13	21,76
	<b>p (Log-rank)</b>	0,47	0,96	0,39
<b>TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	58,66	65,8	77,7
	<b>p (Log-rank)</b>	0,22	0,88	0,38
<b>MMP-2/TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	1,12	1,35	1,5
	<b>p (Log-rank)</b>	0,47	0,88	0,38
<b>MMP-9/TIMP-2</b>	<b>Punto de Corte</b>	0,07	0,12	0,29
	<b>p (Log-rank)</b>	0,47	0,96	0,22

El valores de p en negrilla es el que mejor discrimina (Q2). Ningún valor muestra diferencia de significación estadística.

En la serie analizada no se detectan diferencias de significación estadística en términos de supervivencia libre de progresión. No obstante, el valor Q2 de MMP-2 es el que mejor discrimina entre las variables analizadas en términos de SLP (Log-rank,  $p=0,12$ ) (Figura 35). A 5 años el 28,6% de los pacientes con MMP-2 <99,74 ng/mL progresan a enfermedad músculo-infiltrante, mientras que ningún paciente

**TABLA XXVI: MMP-2 y probabilidad de progresión en cáncer no músculo-invasivo.**

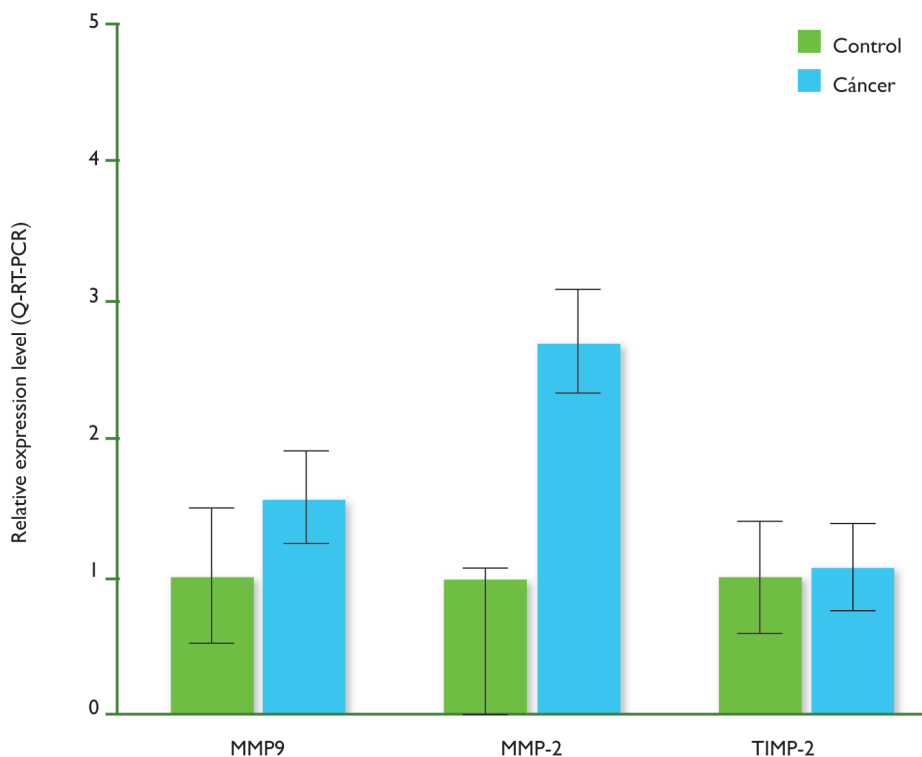
<b>MMP-2</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>IC 95% Superior</b>	<b>IC 95% Inferior</b>
< 82,75 ng/mL	12 meses	0	0	0
	24 meses	0,143	0,666	0,021
	36 meses	0,286	0,742	0,08
> 82,75 ng/mL	12 meses	0	0	0

con MMP-2 >99,74 ng/mL progresa (Tabla XXVI, Figura 35). Evidentemente estos resultados deben tomarse con cautela debido al escaso tamaño de la muestra objeto de análisis. Realmente se necesitan estudios futuros que amplíen el tamaño de la serie a analizar y con mayor seguimiento, y que deseablemente se lleven a cabo en diferentes instituciones. Sólo de esta forma podrán validarse los hallazgos detectados. De momento, la detección de gelatinasas en suero de paciente con cáncer, y sobre todo si se tiene también en cuenta la expresión relativa de las mismas al inhibidor tisular TIMP-2, podrían resultar elementos prometedores, tanto en el diagnóstico no invasivo de la enfermedad como en la estadificación molecular de la misma.

#### **4.7. DETECCIÓN DE CÁNCER BASADA EN NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm DE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA**

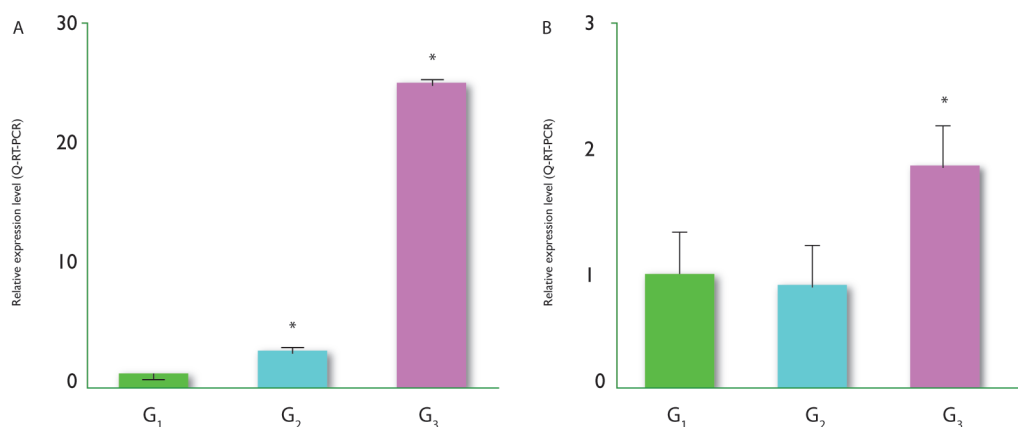
Lógicamente, niveles proteicos elevados de una o diversas sustancias han de correlacionarse con niveles de expresión de ARNm elevados de esas mismas sustancias. Así mismo, este ARNm elevado también refleja un nivel mayor de transcripción génica de esos mismos elementos. Hemos analizado en la misma serie de forma semi-cuantitativa los niveles de expresión génica de los mismos marcadores: MMP-2, MMP-9, TIMP-2, y de los cocientes MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2. Del mismo modo que en algunos casos los niveles proteicos séricos de algunas de estas sustancias permiten predecir la presencia de cáncer frente

a controles, los niveles de ARNm en células mononucleares de sangre periférica (linfocitos, polimorfonucleares y monocitos) tienen potencial para ser de utilidad a la hora de establecer el diagnóstico molecular de la enfermedad, tal vez incluso de forma más sensible que mediante determinación de proteínas por ELISA en suero. De hecho, resulta muy probable que exista una buena correlación entre los niveles proteicos en suero y los niveles de ARNm en células mononucleares sanguíneas de los mismos pacientes y de los mismos controles. La muestra analizada en este estudio (n=42) muestra unos niveles en estado constante de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2.



**Figura 36:** Comparación entre la expresión relativa de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 entre casos y controles. U Mann-Whitney (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$

En la sangre periférica de pacientes con neoplasia vesical los niveles normalizados de ARNm de MMP-9 y MMP-2 son respectivamente  $1,82 \pm 0,6$  y  $2,7 \pm 0,6$  veces más altos en pacientes con cáncer que controles ( $p < 0,05$ ). Ahora bien, los niveles normalizados de TIMP-2 no muestran las diferencias entre controles y pacientes con neoplasia (Figura 36, Tabla XXVII). Cuando se analiza exclusivamente la población de pacientes con carcinoma urotelial de vejiga confirmado histológicamente ( $n=31$ ), tanto los niveles de ARNm de MMP-9 y MMP-2 en células mononucleares de sangre periférica se correlacionan con el grado histológico (Figura 37). El nivel MMP-9 es



**Figura 37:** Comparación entre la expresión relativa de MMP-9 (A) y MMP-2 (B) según grado tumoral de las lesiones neoplásicas. U Mann-Whitney (\*)  $p < 0,05$



más alto en tumores de grado 3 ( $8,31 \pm 0,38$  veces) y grado 2 ( $8,80 \pm 0,33$  veces), que en los tumores grado 1 ( $p < 0,05$ ). MMP-9 es significativamente más alto en tumores de grado 3 ( $1,97 \pm 0,34$  veces) en comparación con grado 1 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no existe diferencia entre el nivel ARNm de grado 2 ( $0,89 \pm 0,37$  veces) y grado 1. Los niveles normalizados de TIMP-2 no muestran las diferencias relativas en cuanto a las diferentes clasificaciones de grados, aunque se mostró una tendencia a expresión disminuida en tumores G3 en comparación a G1 y/o G2 ( $p = 0,09$ )

**TABLA XXVII.** Cuantificación relativa empleando el método Ct comparativo para MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 como genes diana, y 18S como estándar interno

	MMP-9	18S	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Expresión Relativa (95% C.I.)
<b>Control</b>	29,90 $\pm$ 0,13	19,71 $\pm$ 0,46	10,19 $\pm$ 0,49	0,0 $\pm$ 0,49	<b>1,00</b> (0,71-1,40)
<b>Neoplasia</b>	28,93 $\pm$ 0,31	19,66 $\pm$ 0,10	9,33 $\pm$ 0,34	(-0,87) $\pm$ 0,34	<b>1,82</b> (1,44-2,30)
	MMP-2	18S	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Expresión Relativa (95% C.I.)
<b>Control</b>	33,74 $\pm$ 0,52	19,71 $\pm$ 0,13	14,03 $\pm$ 0,54	0,0 $\pm$ 0,54	<b>1,00</b> (0,69-1,45)
<b>Neoplasia</b>	32,14 $\pm$ 0,34	19,59 $\pm$ 0,10	(-1,43) $\pm$ 0,36	(-1,43) $\pm$ 0,36	<b>2,70</b> (2,10-3,46)
	TIMP-2	18S	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Expresión Relativa (95% C.I.)
<b>Control</b>	24,60 $\pm$ 0,36	19,71 $\pm$ 0,13	4,90 $\pm$ 0,40	0,0 $\pm$ 0,54	<b>1,00</b> (0,75-1,32)
<b>Neoplasia</b>	24,39 $\pm$ 0,28	19,59 $\pm$ 0,10	4,79 $\pm$ 0,31	(-0,11) $\pm$ 0,31	<b>1,08</b> (0,87-1,34)

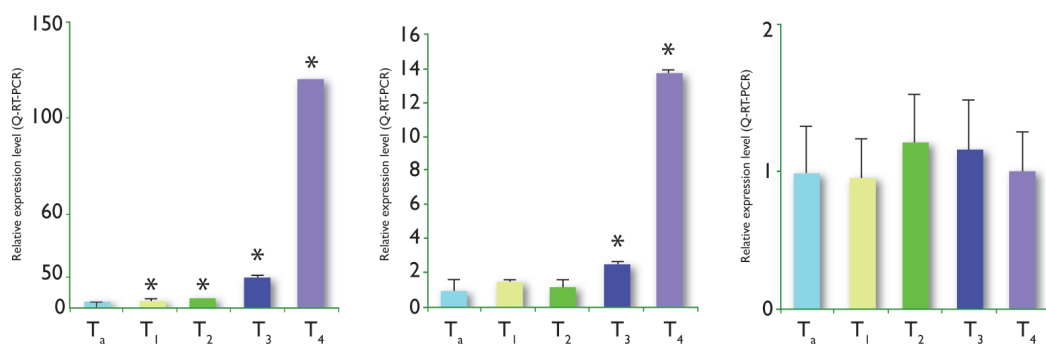
#### **4.8. ESTADIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER BASADA EN NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm DE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA**

En relación con el estadio clínico, tanto el grado de invasión mural en la vejiga (T) como la presencia de metástasis visceral (M) han sido analizados y correlacionados con los niveles de ARNm de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 (Tabla XXVIII). De esta forma se establecen las bases para la estadificación molecular de pacientes con cáncer de vejiga en relación con los niveles de expresión génica en células mononucleares de sangre periférica.

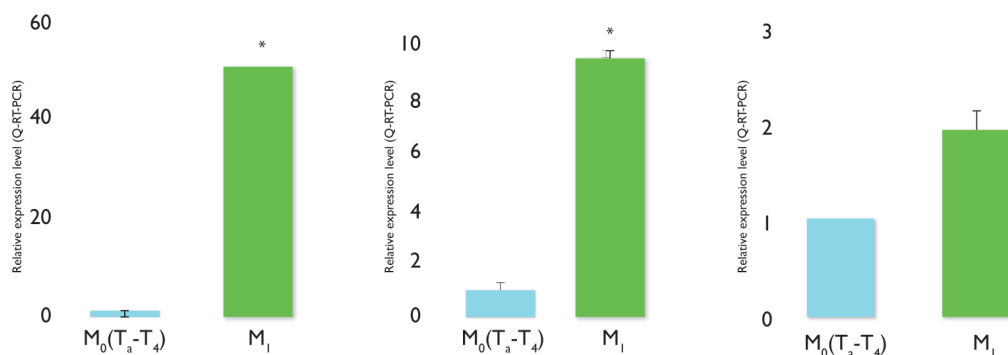
Desde luego, que las células analizadas pueden contener también células tumorales, no sólo células formes de la sangre, lo que sin duda ayudaría a detectar diferentes niveles de expresión génica en pacientes con riesgo de presentar enfermedad metastásica.

En cuanto a la clasificación T, el nivel de MMP-9 en células mononucleares de sangre periférica es significativamente más alto en pacientes con tumores T<sub>4</sub> ( $13,6 \pm 0,36$  veces) y T<sub>3</sub> ( $2,3 \pm 0,3$  veces); sin embargo, no en T<sub>2</sub> ( $1,15 \pm 0,38$  veces), ni en T<sub>1</sub> ( $1,43 \pm 0,27$  veces) al compararlo con lesiones T<sub>a</sub> no invasivas.

La expresión de MMP-2 se correlaciona mejor con la profundidad de invasión, ya que el nivel de MMP-2 fue significativamente más alto en T<sub>4</sub> ( $8,44 \pm 0,38$  veces), T<sub>3</sub> ( $7,7 \pm 0,32$  veces), T<sub>2</sub> ( $4,45 \pm 0,4$ ) y T<sub>1</sub> ( $2,21 \pm 0,34$ ), con respecto a pacientes con enfermedad T<sub>a</sub>. Por otro lado, niveles normalizados de TIMP-2 no muestran diferencias relativas entre clasificaciones (Figura 38, Tabla XXVIII).



**Figura 38:** Comparación entre la expresión relativa de MMP-9 (A) y MMP-2 (B) y TIMP-2 según clasificación T de las lesiones neoplásicas. U Mann-Whitney (\*)  $p < 0,05$ .



**Figura 39:** Comparación entre la expresión relativa de MMP-9 (A) y MMP-2 (B) y TIMP-2 según clasificación M de las lesiones neoplásicas. U Mann-Whitney (\*)  $p < 0,05$

En cuanto a la clasificación M, un incremento estadísticamente significativo se observa en la expresión de MMP-9 ( $9,6 \pm 0,2$  veces), MMP-2 ( $5,22 \pm 0,27$  veces) y TIMP-2 ( $1,97 \pm 0,22$  veces) al comparar enfermedad metastásica al diagnóstico

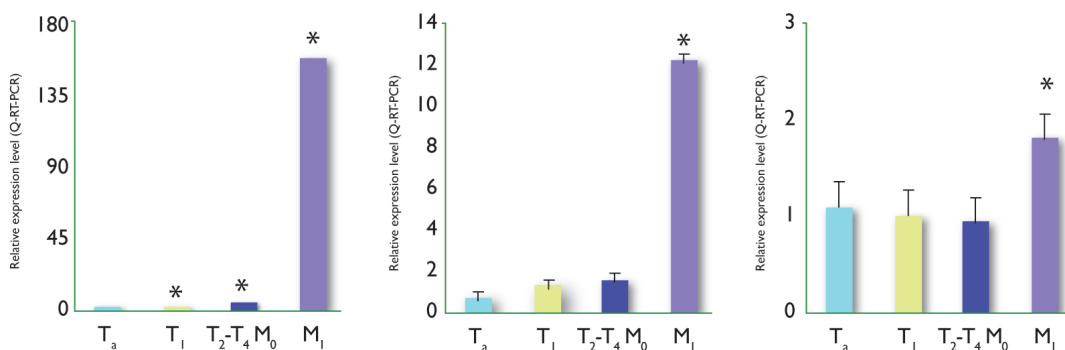
(M<sub>1</sub>) con enfermedad no metastásica (M<sub>0</sub>) ( $p < 0,05$  en todos los casos) (Figura 39, Tabla XXVIII). Es importante reseñar que la actividad MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 detectada en casos con enfermedad metastásica no se debe necesariamente a células tumorales circulantes en torrente sanguíneo; a pesar de que en algunos pacientes este hecho sea posible. La actividad MMP se debe mayoritariamente a células formes de la sangre y otros tipos celulares, como las células endoteliales o fibroblastos estromales asociados al tumor.

De hecho, muchos individuos sin metástasis, al igual que algunos controles, revelan marcada actividad MMP. No se ha practicado separación inmuno-magnética con marcadores específicos de células tumorales entre las células nucleadas de sangre periférica, por lo que se desconoce la proporción de pacientes en los que la expresión estudiada se debe a expresión en células tumorales circulantes.

De hecho MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 no son marcadores específicos de carcinoma urotelial, sino más bien reflejo de muy diversas rutas que incluyen actividad neo-angioénica y remodelación de la matriz extracelular.

Por otro lado, se ha investigado la relación entre la expresión de MMPs y TIMP-2 según diferentes grupos de pacientes con cáncer, estratificando la extensión de la enfermedad teniendo en cuenta ambas categorías T y M, sino: T<sub>a</sub> (no invasivo), T<sub>1</sub> invasivo de la lámina propia (microinvasivo), T<sub>2-4</sub>M<sub>0</sub> invasivo del músculo o más allá (profundamente invasivo) no metastático y T<sub>2-4</sub>M<sub>1</sub> (metastático). La capacidad que tienen los niveles de ARNm de distinguir entre estos 4 niveles diferentes de invasión tumoral es diferente.

MMP-9 es significativamente más alto en T<sub>2-4</sub> M<sub>1</sub> ( $12,72 \pm 0,2$  veces), pero no en pacientes T<sub>2-4</sub> M<sub>0</sub> ( $1,5 \pm 0,21$ -veces) y T<sub>1</sub> ( $1,43 \pm 0,27$  veces) al compararlo con T<sub>a</sub> no invasivo. MMP-2 es significativamente más alto en T<sub>2-4</sub> M<sub>1</sub> ( $12,62 \pm 0,25$  veces), T<sub>2-4</sub> M<sub>0</sub> ( $4,44 \pm 0,26$  veces) y T<sub>1</sub> ( $2,21 \pm 0,34$  veces) respecto a T<sub>a</sub>. El nivel TIMP-2 es significativamente más alto en T<sub>2-4</sub> M<sub>1</sub> ( $1,8 \pm 0,22$  veces) en



**Figura 40:** Comparación entre la expresión relativa de MMP-9 (A) y MMP-2 (B) y TIMP-2 según clasificación por grupos de estadio tumoral de las lesiones neoplásicas. U Mann-Whitney (\*)  $p < 0,05$ .

comparación con la enfermedad T<sub>2-4</sub> M<sub>0</sub>. No obstante, no se observa diferencia entre niveles TIMP-2 de enfermedad T<sub>2-4</sub> M<sub>0</sub>, T<sub>I</sub> ó T<sub>a</sub> (Figura 40).

#### 4.9. PROPUESTA DE UN ÍNDICE PARA AUMENTAR LA CAPACIDAD DE ESTADIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL

Se propone un índice basado en el efecto aditivo de gelatinasas MMP-9 y MMP-2 y el efecto inhibitorio de TIMP-2, que contrarresta la actividad de MMP-2:  $(\text{MMP-9} + \text{MMP-2}) - \text{TIMP-2} / (\text{MMP-9} + \text{MMP-2})$ . Por supuesto, cada expresión génica individual debe ser corregida en relación con la expresión del gen de mantenimiento, 18S. Empleando esta relación la expresión génica combinada relativa es significativamente más alta en neoplasia que en controles ( $4,95 \pm 0,21$  veces;  $p < 0,05$ ) (Tabla XXIX).

Además, la cuantificación relativa usando el método Ct comparativo para este índice aumenta la capacidad de segregar pacientes con tumores de diferentes grados. El índice  $(\text{MMP-9} + \text{MMP-2}) - \text{TIMP-2} / (\text{MMP-9} + \text{MMP-2})$  también

**TABLA XXIX:** Cuantificación relativa empleando el método Ct comparativo para el índice (MMP-9+MMP-2)-TIMP-2 / (MMP-9+MMP-2) para diferenciar cáncer vesical y control

	$\frac{(\text{MMP-9+MMP-2})\text{-TIMP-2}}{(\text{MMP-9+MMP-2})}$	$\Delta\Delta\text{Ct}$	Expresión Relativa (IC 95%)
<b>Control</b>	24,02±0,63	0,0±0,63	<b>1,00</b> (0,65-1,54)
<b>Neoplasia</b>	21,71±0,22	(-2,31)±0,22	<b>4,95</b> (4,26-5,75)

se correlaciona con el grado tumoral, que es más alto tanto en tumores de grado 3 ( $25,2 \pm 0,26$  veces) y de grado 2 ( $2,98 \pm 0,18$  veces) con respecto al grado 1.

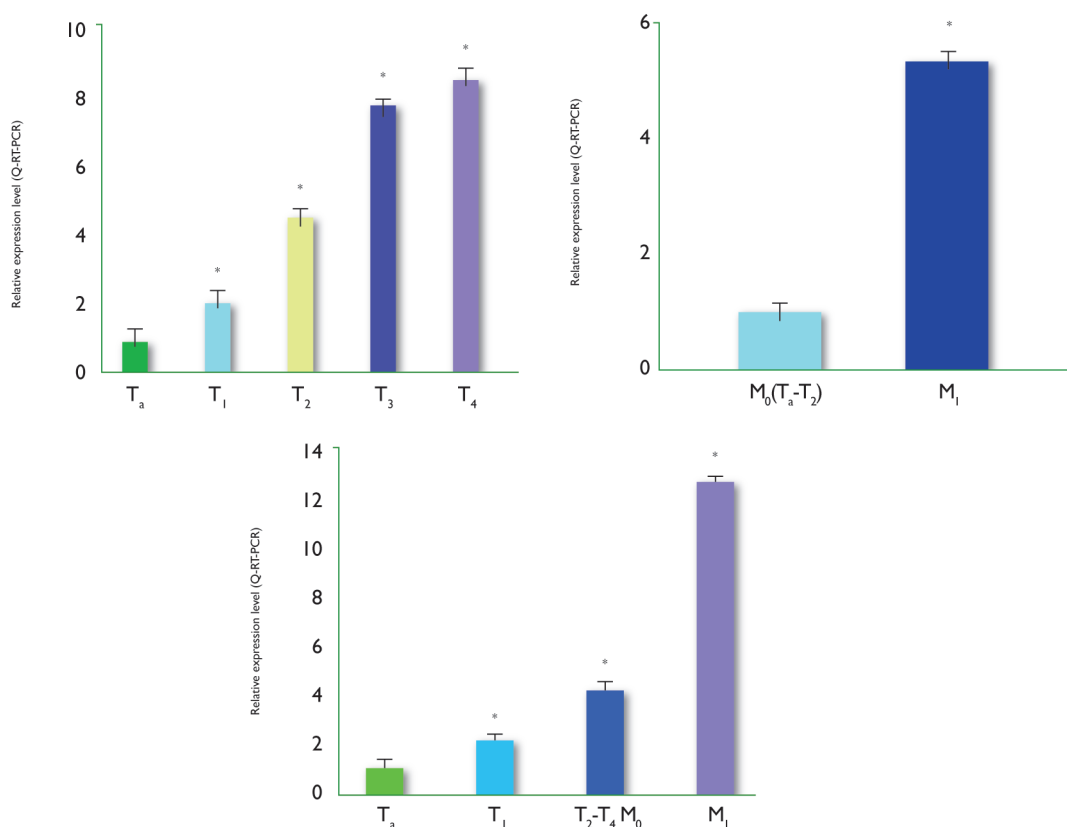
Por otro lado este índice afecta también a los distintos niveles de invasión mural. La profundidad de la invasión es significativamente más alta en T<sub>4</sub> ( $120,1 \pm 0,36$  veces), T<sub>3</sub> ( $18,12 \pm 0,1$  veces), T<sub>2</sub> ( $5,14 \pm 0,36$  veces) y T<sub>1</sub> ( $3,1 \pm 0,07$  veces), con respecto a T<sub>a</sub> (Tabla XXX, Figura 41).

Por si fuera poco, el índice (MMP- 9+MMP-2)-TIMP-2/(MMP-9+MMP-2) sirve también para distinguir enfermedad metastásica, siendo esta diferencia mucho más elevada que con cada uno de los marcadores individuales ( $51,7 \pm 0,24$  veces) frente a enfermedad no metastásica (M<sub>0</sub>). Este hecho implica que tanto a nivel de evaluar el nivel de infiltración, como el riesgo de metástasis al diagnóstico, el índice propuesto discrimina mejor grupos de diferente nivel de expresión.

Igualmente, este índice también segrega mejor que cada marcador individual los grupos que fusionan categoría T y M, siendo significativamente más alto en T2-4 M1 ( $166 \pm 0,15$  veces), T2-4 M0 ( $6,76 \pm 0,36$  veces) y T1 ( $3,06 \pm 0,08$  veces) respecto a T<sub>a</sub>. Este dato apoya aún más la observación de que el índice propuesto aumenta la capacidad de estadificar la enfermedad desde el punto de vista molecular empleando la tecnología de la RT-PCR a tiempo real.

**TABLA XXX:** Cuantificación relativa empleando el método Ct comparativo para el índice (MMP-9+MMP-2)-TIMP-2 / (MMP-9+MMP-2)

	(MMP-9+MMP-2)-TIMP-2 / (MMP-9+MMP-2)	$\Delta\Delta Ct$	Expresión Relativa (IC 95%)
<b>Ta</b>	24,72±0,29	0,70 ±0,29	<b>0,61 (0,50-0,75)</b>
<b>T1</b>	23,11±0,08	(-0,90)±0,08	1,87 (1,77-1,98)
<b>T2</b>	22,36±0,36	(-1,66)±0,36	3,15 (2,44-4,06)
<b>T3</b>	20,54±0,02	(-3,47)±0,01	11,11 (11,22-10,99)
<b>T4</b>	17,81±0,36	(-6,20)±0,36	73,65 (57,25-94,75)
	23,04±0,24	(-0,98)±0,24	1,97 (1,67-2,32)



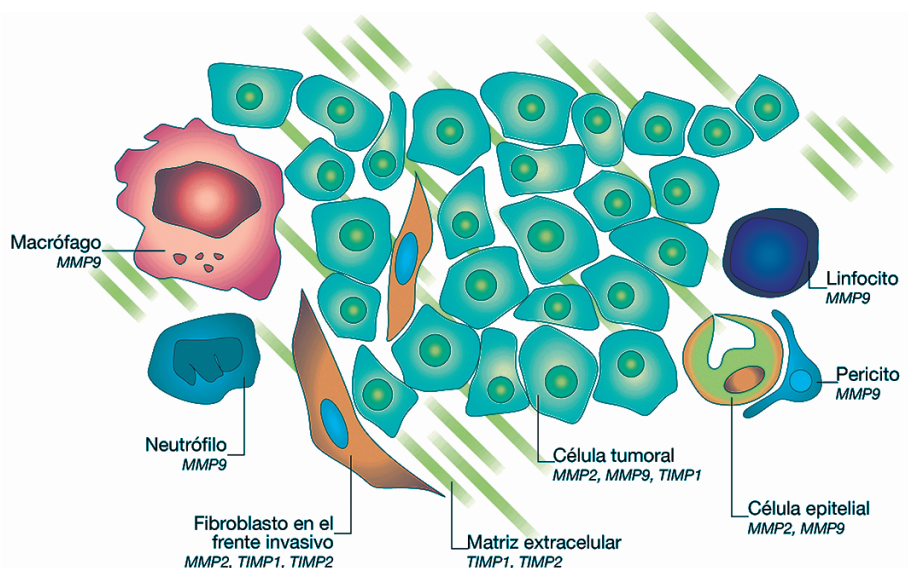
**Figura 41:** Cuantificación relativa empleando el índice (MMP-9+MMP-2)-TIMP-2 / (MMP-9+MMP-2) de ARNm en células de sangre periférica: (A) Categoría T; (B) Categoría M; (C) Clasificación por grupos de estadio tumoral. U Mann-Whitney (\*) p<0,05

## 5. DISCUSIÓN

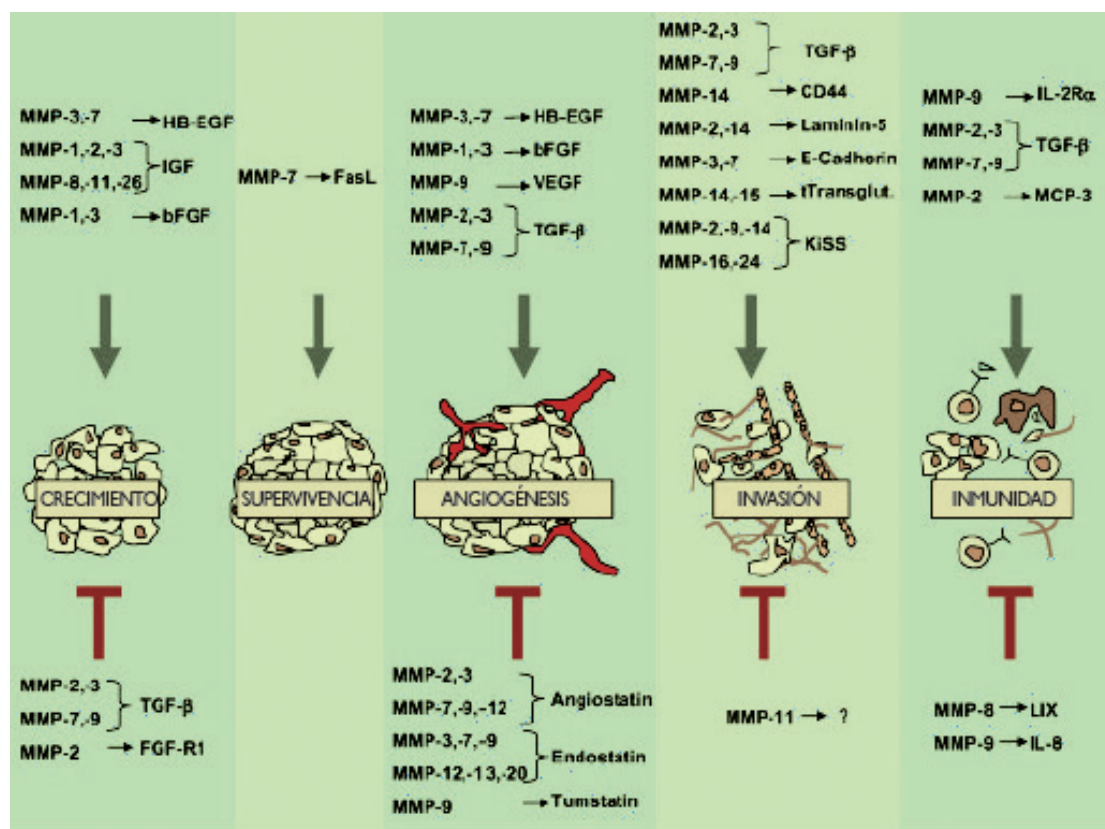
Varios autores han estudiado el papel de las MMP y más específicamente de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y del inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo-2 (TIMP-2) en la neoplasia vesical [193-195,229-248]. Se han aplicado abordajes diferentes para estudiar la actividad de estas enzimas de degradación de la MEC. A menudo se han buscado en tejidos tumorales de la vejiga urinaria, bien en fresco o incluidos en parafina, otras veces en muestras de burbujeo (del francés “*barbotage*”) de orina; incluso en células mononucleares de sangre periférica y más recientemente en el suero de pacientes. Se han utilizado varias técnicas para su análisis, como inmunohistoquímica, PCR a tiempo real, ELISA, *Western Blot*, *Northern Blot* y zimografía. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la expresión de metaloproteinasa ARNm en células mononucleares de sangre periférica mediante RT-PCR a tiempo real y en suero mediante la técnica de ELISA, en un grupo de pacientes con carcinoma de células transicionales de la vejiga, en diferentes categorías y grados de la enfermedad, empleando como control un grupo de sujetos sanos. Diferentes MMPs han sido estudiadas por tener potencial utilidad como marcadores en la detección y predicción de enfermedad neoplásica en vejiga, bien solas o en combinación con otras pruebas diagnósticas disponibles, pero los estudios realizados hasta la fecha se han centrado principalmente en el análisis de gelatinasas (MMP-2, MMP-9) y de su principal inhibidor tisular (TIMP-2), por su capacidad para degradar la matriz extracelular, y por tanto de presentar invasión tumoral local y a distancia; así como por el papel que estas moléculas desempeñan en los mecanismos de angiogénesis y apoptosis. Tanto la capacidad de degradar el estroma, como la de generar nuevos vasos o la evitar la muerte celular programada son, de forma genérica, los principales mecanismos asociados a enfermedad tumoral de mal pronóstico. Sin embargo, cada vez somos más conscientes de que estas sustancias están menos relacionadas con la matriz, como inicialmente se interpretó, y que se trata de una clase de enzimas de carácter ubicuo relacionada con la propia comunicación entre células [249]. No es de extrañar por tanto el papel que desempeñan en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, autoinmunes y en la progresión tumoral [250].



Independientemente de cuál o cuáles sean los mecanismos íntimos, existe acumulada experiencia para poder admitir la existencia de un proceso regulador entre metaloproteinasas e inhibidores de tejido en la progresión tumoral y en el desarrollo de metástasis. La expresión génica y la activación de MMPs se relacionan con el potencial de invasión de las células neoplásicas. Inicialmente se consideró que las MMPs eran producidas exclusivamente por células tumorales. Este concepto fue sustituido por la más extendida creencia de que algunas MMPs son producidas principalmente por el estroma; por ejemplo, estromelisin (MMP-3), producida por los fibroblastos tumorales. De manera similar, TIMP-1 y TIMP-2, tanto en células neoplásicas como estromales se producen contrarrestando la actividad colagenasa y gelatinasa (Figura 42).



**Figura 42:** Esquema que representa las principales fuentes de producción de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 en pacientes con cáncer de vejiga (MEC: matriz extracelular).



**Figura 43:** Funciones de las metaloproteinasas.

Esta familia inhibidora promueve la proliferación tumoral o induce apoptosis en algunos sistemas e inhibe el crecimiento tumoral y promueve la muerte celular en otros (Figura 43) [251]. Esta aparente respuesta contradictoria de TIMP-2, que por una parte actúa como factor de crecimiento y facilita el desarrollo de la metástasis mientras por otro lado inhibe la angiogénesis, se reconoce como respuesta homeostática a una expresión de MMP-2 elevada [252]. La expresión de estas sustancias puede estudiarse de forma muy diversa, evaluando su presencia en muestras tisulares, tanto en tejido neoplásico como en el estroma sano que interacciona con el propio entorno tumoral, en la orina de los pacientes y, tal y como se ha realizado en este trabajo, también en el suero y en células mononucleares

de sangre periférica, ambos procedentes de muestra de sangre de los pacientes. Son muchos los trabajos que confirman la relación existente entre MMPS y sus inhibidores en el carcinoma de células transicionales de la vejiga (Tabla XXXI).

**TABLA XXXI.** Estudios que demuestran la relación entre metaloproteinasas de la matriz y sus inhibidores en el carcinoma de células transicionales de la vejiga.

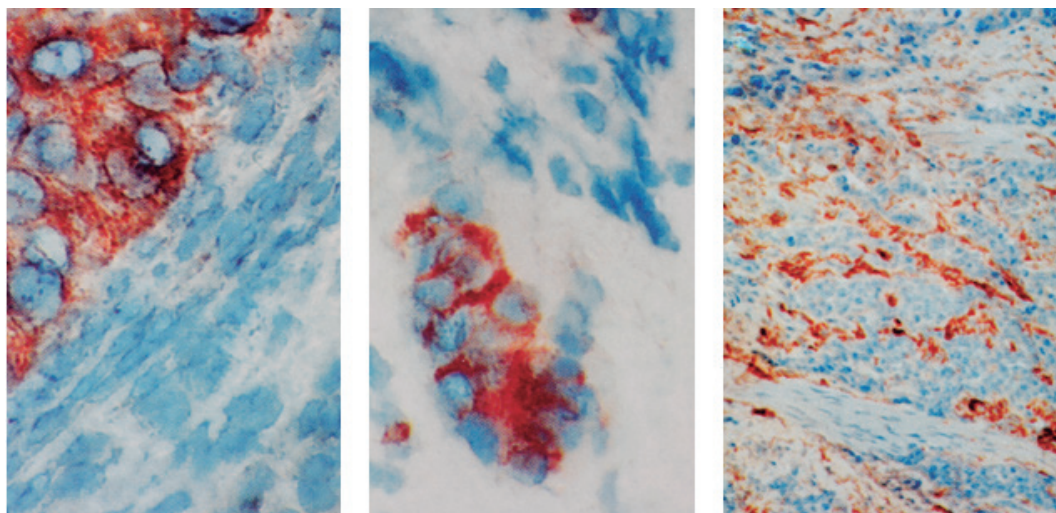
Autor (año)	Pacientes (No.)	Fuente muestra	Método de detección	Conclusiones propuestas
Margulies et al (1992)	55	Orina/Sobrenadante	ELISA, Western Blot, Zimografía	Niveles MMP-2 aumentaron en cáncer sobre control
Davies et al (1993)	49	Tejido / homogeneizado	Zimografía	MMP-9 y MMP-2 correlacionan con estadio y grado
Gohji et al (1996)	233	Suero	ELISA	MMP-2 en enfermedad avanzada
Grignon et al (1996)	42	Tejido / congelado	Inmunohistoquímica	TIMP-2 en células tumorales o estroma peor supervivencia
Moses et al (1998)	10	Orina/Sobrenadante	Zimografía	MMP-9 y MMP-2 detectadas en pacientes con cáncer vesical
Bianco et al (1998)	65	Lavado vesical/ Células exfoliadas	Zimografía	MMP-9 se correlaciona con estadio y grado
Gohji et al (1998)	224	Suero	ELISA	Alta relación MMP-2/TIMP-2 baja supervivencia
Kanayama et al (1998)	41	Tejido / congelado	RT-PCR	MMP-2/TIMP-2 correlacionado con estadio
Hamasaki et al (1998)		Línea celular T24	RT-PCR, EIA	Desequilibrio MMP-2/TIMP-2 implica progresión
Furukawa et al (1998)		Líneas UCT1 y 2	RT-PCR	MMP-2 más alto en implantes línea UCT-1 invasivos
Ozdemir et al (1999)	33	Orina/Sobrenadante	ELISA	MMP-9 detectable en cáncer vesical pero no en controles
Ozdemir et al (1999)	60	Tejido/parafina	Inmunohistoquímica	MMP-9 correlacionada con lisis de membrana basal
Kanda et al (2000)	61	Tejido/congelado	Zimografía	MMP-2 correlaciona con grado, estadio y resultado
Monier et al (2002)	101	Orina	ELISA, inmunotransferencia	Desequilibrio entre MMP-2,-9 y TIMP-2
Guan et al (2003)	52	Suero	ELISA	MMP-9 correlaciona con grado y estadio
Eissa et al (2003)	110	Orina/lavado vejiga	ELISA	MMP-9 aumenta sensibilidad de citología de orina
Gakiopoulou et al (2003)	106	Tejido/Parafina	Inmunohistoquímica	TIMP-2 asociado a grado, estadio y resultado

Autor (año)	Pacientes (No.)	Fuente muestra	Método de detección	Conclusiones propuestas
Vasala et al (2003)	54	Tejido/Parafina	Inmunohistoquímica	MMP-2 correlaciona con estadio y peor supervivencia
Sumi et al (2003)	20	Tejidos/parafina	Inmunohistoquímica	MMP-2 correlaciona con grado y estadio
Chaffer et al (2005)		Líneas TSU-Pr I	RT-PCR	MMP-9 y TIMP-2 aumento en líneas metastásicas
Vasala et al (2007)	94	Suero	ELISA	Alto proMMP-2 y TIMP-2 mejor pronóstico
Rodríguez-Faba et al (2007)	42	Tejido	Inmunohistoquímica	MMP-13 no es útil como marcador en cáncer de vejiga músculo-invasivo
Vasala et al (2008)	84	Suero	ELISA	Bajo TIMP-2 y MMP-2/TIMP-2 peor pronóstico
Fernández et al (2009)	530	Orina	ELISA y zimografía	MMP-9 usado para controlar pacientes
Angulo et al (2011)	42	Células mononucleares de sangre periférica	RT-PCR a tiempo real	MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 permite diagnóstico y estadificación molecular
Szarvas et al (2011)	228	Orina	ELISA Western Blot	MMP-7 elevado significativamente en cancer vesical metastásico
Ramón de Fata et al (2013)	42	Suero	ELISA	MMP-9 y MMP-9/TIMP-2 útiles como marcadores tumorales en el diagnóstico de cáncer vesical

Davies et al. describieron la existencia de una correlación significativa entre grado tumoral y expresión de pro-MMP-9 en el cáncer vesical [193]. Este estudio analizó biopsias de 42 pacientes con carcinoma de células transicionales y de 7 sujetos normales mediante zimografía de gelatina cuantitativa e hibridación in situ para identificar las formas pro y activas de MMP-2 y MMP-9. Detectaron expresión de ambas enzimas tanto en tejido benigno como maligno. Los niveles de pro-MMP-9 fueron significativamente mas elevados en los tejidos neoplásicos vesicales que en los tejidos benignos. Además, los niveles de pro-MMP-9 y de MMP-2 activada aumentaron con el grado tumoral. La expresión de MMP-2 activa e inactiva no difirió significativamente entre los tejidos normales y neoplásicos. Otro interesante hallazgo fue la localización estromal y no epitelial del ARNm de ambas enzimas, lo que implica su mayoritaria producción en el estroma. Además, estos autores apuntan que la elevación de los niveles de MMPs no se correlaciona con la afectación de los ganglios, porque los vasos linfáticos no presentan una estructura rígida como en el árbol vascular y por tanto las células tumorales no precisan la actividad de las MMPs para establecer el proceso de invasión y metástasis. En nuestro trabajo la determinación sérica mediante ELISA de niveles altos de MMP-9 y el cociente MMP-9/TIMP-2 fueron las variables de mayor utilidad a la hora de discriminar entre casos y controles y, por tanto, para establecer un diagnóstico “molecular” de cáncer de vejiga.

Diferentes estudios han confirmado que la expresión inmunohistoquímica (IHQ) de MMPs conlleva un papel pronóstico en el cáncer de vejiga. Grignon et al. llevaron a cabo un estudio inmunohistoquímico que evaluaba la expresión, distribución y las implicaciones en el pronóstico de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y colágeno tipo IV en muestras congeladas de 42 pacientes con cáncer músculo-invasivo de vejiga a los que se les practicó cistectomía radical [194]. Se encontraron gelatinasas en el 71% de los tumores mediante inmunohistoquímica, que predominantemente se localizó en células tumorales. Las gelatinasas mostraron una tinción leve y difusa dentro del estroma. No pudo identificarse una correlación entre la presencia de

MMP-2 o MMP-9 y el estadio patológico o el grado. Las áreas de tejido benigno dentro de la neoplasia no mostraron inmunoreactividad con anticuerpos frente a MMPs, lo que sugería una expresión específica en el tejido maligno (Figura 44).



**Figura 44.** Expresión inmunohistoquímica de MMP-9 (A), MMP-2 (B) y TIMP-2 en muestras de pacientes con cáncer vesical. La expresión de gelatinasas (A y B) se muestra mayoritaria en células tumorales, mientras que la expresión del inhibidor TIMP-2 es mayoritaria en el estroma peritumoral (C).

En este mismo estudio la expresión de MMPs no se correlacionó con la supervivencia. TIMP-2 se detectó en células tumorales y en el tejido estromal en 62% y 76% de los casos, respectivamente (Figura 44). El hallazgo más importante consistió en que la inmunoreactividad a TIMP-2 se presentó tanto en el estroma como en células tumorales, asociándose a pérdida de colágeno tipo IV y a escasa supervivencia. De manera interesante, la tinción más marcada de TIMP-2 se apreció alrededor de nidos celulares de tumor infiltrante. Este patrón implicaba la pérdida extensa o completa de la membrana basal. Además, el nivel de TIMP-2 estromal se correlacionaba con escasa supervivencia. Estos hallazgos desvelaron un paradigma

nuevo en las interacciones entre MMPs y TIMPs, y su relación con la progresión tumoral donde una alta expresión del inhibidor, y no del enzima, se asoció con mala supervivencia.

Debemos reconocer que estos resultados difieren en parte con los obtenidos en nuestro trabajo, donde niveles elevados de TIMP-2 no discriminan entre grupos de diferente pronóstico, aunque por el contrario, niveles de MMP-2 >120 ng/mL se relacionan con diferente pronóstico en el análisis univariante (SCE). Probablemente las distintas características de la serie analizada y el diferente método de análisis empleado tengan relación con los resultados, puesto que todos los pacientes del trabajo de Grignon et al tenían enfermedad músculo-invasiva.

Kanayama et al. evaluaron MMP-2, TIMP-2 y MTI-MMP, en muestras de tejido de 41 pacientes con cáncer de vejiga con diferentes grados y categoría T, empleando RT-PCR y encontraron una firme asociación entre estadio y pronóstico y la expresión de MMP-2 y TIMP-2. Sin embargo, la expresión de MTI-MMP se relacionó con enfermedad a distancia, pero no con invasión local [253].

Ozdemir et al. describieron en 1999 los hallazgos de un estudio inmunohistoquímico para MMP-1, MMP-2 y MMP-9 en 60 pacientes con cáncer vesical. De ellos, 23 eran superficiales (Ta), 18 carcinoma in situ (Cis) y 19 enfermedad infiltrante (T1 o mayor). Existía una fuerte correlación entre la inmunotinción de MMP-9 y la pérdida del colágeno tipo IV en cada grupo, siendo más notable en aquellos pacientes con Cis (89% y 83%, respectivamente) [229].

Sumi et al. [244] examinaron la expresión de los niveles de MMP2 y MMP7, y, aunque solamente evaluaron 20 pacientes, concluyeron que la expresión de MMP2 estaba relacionada de forma importante con los tumores de estadio y grado más avanzado que con los de bajo estadio y grado. En 2002 Xu et al. [254] estudiaron 35 pacientes y determinaron la expresión de ARNm mediante RT-PCR concluyendo



que los elevados niveles de MMP2 son proporcionales con el grado y el estadio. En nuestro caso el análisis semi-cuantitativo de ARNm de MMP-2 y MMP-9 mediante RT-PCR puso de manifiesto niveles normalizados superiores en pacientes con cáncer con respecto a los controles ( $2,7 \pm 0,6$  y  $1,82 \pm 0,6$ , respectivamente). Además, el nivel de ARNm de MMP-9 es más alto en tumores de alto grado (G3) y, con respecto al estadio clínico, el nivel de MMP-9 en células mononucleares de sangre periférica es significativamente más alto en pacientes con tumores localmente avanzados (T<sub>3</sub>-T<sub>4</sub>). Por otro lado, y de forma complementaria, la expresión de MMP-2 se correlaciona mejor con la presencia inicial de invasión tumoral; debido a que el nivel de MMP-2 fue significativamente más alto en pacientes con tumores T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>, con respecto a pacientes con enfermedad T<sub>a</sub>. Este hecho indica una capacidad discriminativa para detectar infiltración estromal incipiente, que incluye la mera invasión del tejido conectivo subepitelial (lámina propia) de la vejiga urinaria [255]. De confirmarse estas conclusiones en futuros estudios a mayor escala, es posible que tanto MMP-2 como MMP-9 tengan utilidad para diferenciar niveles de afectación tumoral en la pared vesical, y que la capacidad de detectar la infiltración conectiva sea más epicrítica para MMP-2 que para MMP-9, al menos en lo que respecta a la RT PCR a tiempo real.

Por el contrario en nuestra experiencia los niveles normalizados de TIMP-2 no muestran diferencias relativas entre los diferentes niveles de invasión tumoral en la pared vesical. Gakiopoulou et al. estudiaron hace una década TIMP-2 mediante IHQ en 106 tumores de distintos estadios y grados relacionando los niveles de expresión de TIMP-2 con el grado tumoral y con diversos marcadores de proliferación celular (Ki67) y de apoptosis (p53), sin detectar claras diferencias entre distintos niveles de infiltración [241].

Por otro lado, si tenemos en cuenta la predicción de pronóstico, Vasala et al. encontraron mediante análisis inmunohistoquímico en tejido que la sobreexpresión de MMP-2 puede ser un marcador pronóstico independiente de progresión en el cáncer de vejiga. Nuestros resultados también revelan una relación estrecha entre MMP-2 y



progresión en tumores no músculo-invasivos (SLP), aunque posiblemente en base al escaso número de pacientes, sin alcanzar significación estadística ( $p=0,12$ ) [246].

Otros trabajos han confirmado que la expresión IHQ de MMP-9, MMP-2, y MMP-7 en tejido parafinado conlleva implicaciones de peor pronóstico [229,242]. Grimm et al. llevaron a cabo el análisis de 1.176 genes relacionados con cáncer vesical y demostraron expresión de MMP-2 y TIMP-2 mediante RT-PCR en tejido en todos los pacientes que fallecieron por la enfermedad [256]. Mucho más recientemente Rodríguez Faba et al. analizaron la expresión inmunohistoquímica de MMP-13 (colagenasa 3) en pacientes con carcinoma urotelial de vejiga músculo-invasivo, pero no encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con el grado y categoría T, concluyendo que la expresión de MMP-13 carece de utilidad como marcador de invasión tumoral [257]. A pesar de ello, existe importante cuerpo de conocimiento que soporta el hecho de que la expresión de MMPs en tejido constituye un paso fundamental en la progresión tumoral del cáncer de vejiga [250,258].

Desde el punto de vista clínico, el interés por detectar en fluidos biológicos este tipo de marcadores, y de evaluar en su correcta medida las implicaciones que supone su determinación en orina o en suero supone aún un campo de mayor interés con implicaciones importantes en el diagnóstico, evaluación de pronóstico y monitorización de la enfermedad. Los resultados obtenidos con muestras de orina procedentes de pacientes con neoplasia vesical, parecen indicar su mayor utilidad para detección de progresión e invasión tumoral que para el diagnóstico precoz de la enfermedad, la sensibilidad de MMPs en orina es incluso menor que la de la citología de orina. Sin embargo, el empleo de MMP-9 como posible marcador diagnóstico debe ser investigado, debido a su alta especificidad, comparable incluso a la de la citología urinaria, como sugieren algunos autores. Empleando zimografía en gelatina cuantitativa se confirmó la detección en orina de MMP-2 y MMP-9 en tumores vesicales [232] y su correlación con el estadio y el grado tumoral

[193,195,237]. Marguiles et al fueron pioneros al sugerir que la neoplasia vesical se correlaciona con un aumento en la actividad colagenasa, en su trabajo concluyeron que pro-MMP-2 y sus fragmentos activos podían usarse como marcadores en el diagnóstico y para el pronóstico del cáncer vesical analizando los sobrenadantes de la orina de 37 pacientes con carcinoma de células transicionales, 17 con enfermedad inflamatoria y 19 sujetos normales de control [230].

Moses et al. mejoraron estos resultados al evaluar sobrenadantes de la orina de 117 pacientes, de los cuales 68 tenían diversos tipos de cáncer y 49 no habían tenido ninguna evidencia de enfermedad neoplásica [232]. Estudiaron la expresión de MMPs mediante zimografía de gelatina y técnicas de inmunobloting. De manera global, encontraron elevada correlación entre pro-MMP-9 y pro-MMP-2 en orina y presencia de cáncer (mama, riñón, próstata y vejiga). Aunque solo 10 pacientes de su serie tenían cáncer de vejiga, el 70% y el 30% de ellos expresaron pro-MMP-9 y pro-MMP-2, respectivamente. En ninguno de los grupos se encontraron fragmentos de formas activas.

Bianco et al. midieron la expresión de gelatinasas en células de vejiga exfoliadas [195]. Este estudio prospectivo que obtenía lavado por “barbotage” de la vejiga en el momento de la cistoscopia estimaba las cantidades de proteína a partir de estas fracciones celulares y realizó zimografía de gelatina cargando unas cantidades fijas de proteínas. Los resultados se compararon con estudios citológicos y estudios histológicos en tejido procedente de los mismos pacientes. Un total de 65 pacientes recibieron el estudio cistoscópico. De ellos 26 tenían carcinoma de células transicionales, 24 no tuvieron enfermedad activa y 15 fueron controles. Los investigadores detectaron una correlación significativa entre la expresión de pro-MMP-9 y la presencia de carcinoma transicional en la vejiga. Además, los pacientes que sobreexpresaban esta enzima tenían tumores de mayor estadio histopatológico y peor grado. También describieron la pérdida de expresión de pro-MMP-2 y de cualquiera de sus formas activas.

Más recientemente, algunos de estos hallazgos han sido corroborados por dos grupos separados de investigadores [229,242]. Ozdemir et al. estudiaron 33 pacientes con cáncer vesical y 16 controles sanos, llevando a cabo ELISA en los especímenes de orina. Detectaron pro-MMP-9 en todos los pacientes con cáncer y en ninguno de los controles, lo que sugiere la posible utilidad de este enzima en el cribaje del cáncer de vejiga [229]. Durkan et al. estudiaron 165 pacientes de los cuales 129 tenían cáncer vesical y describieron asociación entre la expresión de pro-MMP-9 y TIMP-1 y la presencia de cáncer vesical. Además, los niveles más altos de ambos se daban en los estados histopatológicos mas avanzados. Ahora bien, solo los niveles de TIMP-1 predijeron con exactitud la progresión tumoral [242]. Nosotros establecimos unos valores séricos como punto de corte para MMP-9 de 3,93 ng/mL, que permite también discriminar entre casos y controles con una sensibilidad y especificidad para predecir ocurrencia de cáncer de 90% y 81%, respectivamente. Esta experiencia apoya sólidamente la utilidad de este nuevo marcador sérico como una posible herramienta no invasiva para la detección de cáncer vesical.

También se han descrito asociados a cáncer de vejiga niveles elevados de MMP-1 en orina. Nutt et al. demostraron que los tumores T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub> tenían niveles significativamente más altos de MMP-1 si se comparaban con tumores no músculo-invasivos. Los niveles de MMP-1 se correlacionaron también con grados escasamente diferenciados y estuvieron ausentes en controles normales [259]. Los autores explicaron este hallazgo sugiriendo que las células epiteliales secretan MMP-1 en respuesta a la estimulación del receptor del factor epidérmico de crecimiento por EGF, proporcionado así datos *in vitro* que confirman su observación.

El estudio mediante técnicas de ELISA en el sobrenadante de la orina posiblemente sea el más sencillo de llevar a cabo y uno de los más investigados. Eissa et al. mostraron que la detección de MMP-9 puede ser útil para aumentar la sensibilidad de la citología de orina [240]. Otros autores, plantearon también que

este marcador en orina se correlaciona con el estadio y con el tamaño tumoral [242]. Offersen et al. defienden que la determinación de MMP-9 en la orina de los pacientes con cáncer vesical es incluso factor independiente de mal pronóstico [175]. Di Carlo et al. en 2006 determinaron en la orina de pacientes con tumores vesicales de diferente estadio y grado los niveles de MMP2, MMP9, *polypeptide specific antigen* (TPS) y *protein 22 of nuclear matrix* (NMP22) [260]. Los niveles de TPS y NMP22 eran superiores en tumores G3 que en tumores G1 y G2 y los valores en orina de estos dos marcadores correlacionados con el incremento de los niveles de MMP-9 se encontraban presentes en los tumores de mayor estadio y grado. Szarvas et al. determinaron la presencia de MMP-7 en la orina de pacientes con cáncer de vejiga empleando ELISA y *Western Blot* y observaron que MMP-7 podía contribuir a favorecer la detección de enfermedad metastásica [261].

También se han llevado a cabo estudios serológicos mediante técnica de ELISA para determinar niveles de MMPs y otras sustancias relacionadas. Los estudios serológicos con MMPs en el cáncer de vejiga fueron iniciados por Nauro et al. que demostraron asociación entre niveles séricos elevados de TIMP-1 y metástasis en 69 pacientes con cáncer de vejiga y 16 voluntarios sanos. Encontraron que los pacientes con tumores avanzados o metastásicos tenían casi el doble de nivel sérico de TIMP-1 (determinado por ELISA) cuando se comparaban con los controles [262]. Los datos obtenidos mediante el estudio de niveles séricos de gelatinasas y TIMP-2, en nuestra serie también parecen sugerir que MMP-2 y MMP-9 discriminan mejor los niveles de invasión parietal (categoría T), mientras que TIMP-2 discrimina mejor la existencia o no de afectación metastásica (categoría M).

Inicialmente Gohji et al. no hallaron ninguna diferencia entre los niveles circulantes de MMP-2 correspondientes a pacientes con neoplasia superficial y controles, aunque sí detectaron niveles de MMP-2 más elevados en enfermedad avanzada. Estos hallazgos son muy similares a los reflejados en nuestro trabajo. Más tarde, el mismo grupo, estudió los niveles circulantes de MMPs y TIMP-2 en

suero [233,263]. Empleando inmunoensayos enzimáticos ultrasensibles midieron las concentraciones de MMP-2, MMP-3 y TIMP-2 en 233 pacientes con o sin carcinoma de células transicionales superficial o avanzado. Los pacientes con tumores en estadio avanzado tenían elevaciones significativas en los tres enzimas y, lo que es aún más importante, los pacientes con elevación de MMP-2 o MMP-3 o ambos eran más proclives a presentar enfermedad recurrente después de la resección completa de su tumor. Cuando los pacientes tenían la proporción MMP-2/TIMP-2 elevada existía mayor probabilidad de recurrencia y de progresión de la enfermedad.

En este trabajo no podemos garantizar datos fiables acerca de la recurrencia tumoral y de la progresión tumoral en pacientes con enfermedad no músculo invasiva, puesto que la muestra de pacientes con tumores no músculo-invasivos ( $T_a-T_1$ ) queda limitada a simplemente 15 pacientes. Ahora bien, empleando como punto de corte los valores del primer cuartil (Q1) de MMP-2 y de MMP-2/TIMP-2 si demostramos diferencias de significación estadística en términos de SLR en estos pacientes (Log-rank,  $p=0,02$ ). Con un valor sérico de MMP-2 de 82,75 ng/mL podemos discriminar grupos con diferente riesgo de recurrencia tumoral en pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo. A 5 años presentan recurrencia el 66,7% de los pacientes con MMP-2 <82,75 ng/mL frente al 41,7% de los que presentan MMP-2 >82,75 ng/mL. Igualmente, un valor sérico de MMP-2/TIMP-2 de 1,12 también resulta útil en nuestro análisis para discriminar grupos con diferente riesgo de recurrencia en pacientes con cáncer vesical no músculo-invasivo. Por el contrario, no se han detectado diferencias de significación estadística en términos de supervivencia libre de progresión. Aún con todo, el valor Q2 de MMP-2 es el que mejor discrimina entre las variables analizadas en términos de SLP (Log-rank,  $p=0,12$ ).

La determinación sérica de MMP-9 se reconoce como factor molecular que favorece la génesis y predice la progresión de cáncer vesical y de cáncer de mama [239,264,265]. También se ha propugnado que el ratio MMP-2/TIMP-2 calculado

mediante ELISA en suero se asocia a cáncer de vejiga con peor pronóstico [246]; e incluso que el ratio MMP-9/TIMP-1 es un factor predictivo de recurrencia en cáncer vesical no músculo-invasivo [242].

Estos datos parecen altamente concordantes con los que detecta nuestro trabajo. Confirmamos el papel de MMP-9, TIMP-2 y el cociente MMP-9/TIMP-2 para la predicción del desarrollo de cáncer vesical, aunque con respecto a la progresión no se detectan grandes hallazgos. Ahora bien, como ya se ha señalado, entre las variables analizadas el valor de MMP-2 es el que mejor discrimina en términos de SLP. A 5 años el 28,6% de los pacientes con MMP-2 <99,74 ng/mL progresan a enfermedad músculo-infiltrante, mientras que ningún paciente con MMP-2 por encima de este valor progresa.

Posiblemente sea aún más importante otro hallazgo fundamental en nuestro estudio, el hecho de que la determinación de MMP-9 y también del cociente MMP-9/TIMP-2 mediante técnica de ELISA se comportan como marcadores clínicos de utilidad para la detección de la enfermedad. MMP-9 y MMP-2 aumentan sus niveles en pacientes con lesiones más avanzadas, lo que sugiere una mejor discriminación para evaluar la categoría T; mientras que TIMP-2 aumenta también en la enfermedad que tiene metástasis al diagnóstico, lo que podría suponer que discrimine mejor la presencia de metástasis o categoría M.

Además, los resultados obtenidos con la determinación sérica de MMP y TIMP-2 mediante ELISA en nuestro trabajo se complementan con los observados mediante la detección de ARNm de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, empleando RT-PCR a tiempo real en células mononucleares de sangre periférica, en el mismo grupo de pacientes [266,267]. Se corrobora el hallazgo de que la actividad gelatinasa, especialmente corregida por la actividad TIMP-2, supone una forma nueva de entender la estadificación molecular del cáncer vesical empleando marcadores no específicos de cáncer vesical [266-268].

Ahora bien, no cabe ninguna duda de que la técnica de ELISA para determinar niveles proteicos de MMP-9 y de TIMP-2 supone una medición mucho más sencilla, fácil de reproducir, y cuantitativa que la de la comparación normalizada de los niveles de ARNm de estos mismos elementos mediante RT-PCR a tiempo real. De hecho, esta solamente ofrece una determinación semicuantitativa o, lo que es lo mismo, comparativa entre grupos de forma relativa. Además, son esperables ciertas discrepancias entre los niveles de ARNm en estado constante y la correspondiente actividad enzimática por diferente regulación a nivel post-transcripcional.

A pesar de todas las limitaciones técnicas y metodológicas, numerosos estudios revelan que la expresión incrementada de MMP-2 y TIMP-2 puede ayudar a determinar el pronóstico de los pacientes con cáncer de vejiga [193,194,231,237,241,243,244]. Un estudio que analiza 1.176 genes relacionados con el cáncer por RT-PCR en tejidos vesicales neoplásicos ha demostrado que MMP-2 y TIMP-2 se expresaron en el 100% de los pacientes que fallecieron como consecuencia de la enfermedad [256]. Investigaciones sobre otros MMP como matrilisina (MMP-7) también parecen prometedoras para pronosticar el resultado de pacientes con cáncer de vejiga [261], aunque no se puede decir lo mismo para colagenasa 3 (MMP-13) [257].

Según los datos obtenidos en este trabajo, para poder establecer el diagnóstico de cáncer vesical, o lo que es lo mismo discriminar entre pacientes con cáncer y controles sanos, MMP-9 y MMP-9/TIMP-2 son las variables que ofrecen mejores perspectivas. Ahora bien, para predecir el pronóstico de los pacientes con cáncer vesical son MMP-2, MMP-2/TIMP-2 y MMP-9/TIMP-2 las variables más prometedoras.

Para el diagnóstico de la enfermedad proponemos unos puntos de corte de MMP-9 y MMP9/TIMP-2 que permiten discriminar eficazmente pacientes con cáncer y controles sanos. Posiblemente, si aplicamos criterios de eficiencia, sea

mejor basar esta distinción en la determinación aislada de MMP-9, lo que supone una reducción importante del coste sin pérdida de exactitud diagnóstica. Pero, si tenemos también en cuenta la información relativa al pronóstico, analizar MMP-9 y TIMP-2 de forma independiente para poder establecer su cociente es la única manera de poder llevar a cabo un diagnóstico y una evaluación de pronóstico altamente efectivas al mismo tiempo. Este hecho permite plantear el valor añadido de determinar TIMP-2 asociado a MMP-9 sobre la determinación de MMP-9 exclusivamente. El punto de corte óptimo para MMP-9/TIMP-2 en nuestro análisis fue 0,053. Con este valor se consigue una sensibilidad de 97% y especificidad de 88% para establecer el diagnóstico de cáncer vesical.

Estos parámetros son levemente superiores a los detectados para el punto de corte de MMP-9. No obstante, para establecer el cociente MMP-9/TIMP-2 se necesitan dos determinaciones y el ABC respecto a MMP-9 es estrictamente equivalente. Desde luego, será necesario llevar a cabo estudios de coste efectividad que tengan en cuenta las implicaciones económicas aquí manifestadas acerca de si la doble determinación es más necesaria que la determinación simple.

Para aumentar la capacidad de estadificación molecular mediante RT-PCR hemos propuesto un índice basado en el efecto aditivo de gelatinasas MMP-9 y MMP-2 y el efecto inhibitorio de TIMP-2, que contrarresta la actividad de MMP-2. El índice se establece como  $\frac{(MMP-9+MMP-2)-TIMP-2}{(MMP-9+MMP-2)}$  y cada expresión génica individual se corrige en relación con la expresión del gen de mantenimiento, 18S.

Empleando esta relación la expresión génica relativa es significativamente más alta en neoplasia que en controles. Además, éste índice se correlaciona con el grado tumoral, con la invasión local y diferencia mejor la enfermedad metastática. Todos estos datos apoyan el que dicho índice puede aumentar la capacidad de estadificar la enfermedad, desde el punto de vista molecular, empleando la tecnología



de la RT-PCR a tiempo real.

A pesar de la contundencia de los resultados obtenidos debemos insistir en que MMP-9 no es un marcador de neoplasia, sino de ambiente tumoral; por lo que no es plenamente específico de cáncer. De hecho, la función de MMPs en condiciones no neoplásicas con abundante angiogénesis como la gestación, la curación de lesiones o diversas enfermedades inflamatorias ha sido bien documentada [264,269]. MMP-9 se expresa predominantemente en neutrófilos, macrófagos y mastocitos, más que en células neoplásicas propiamente dichas [252,264]. La reacción local inflamatoria que suele asociarse a neoplasia avanzada también podría estimular la sobreexpresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2. Así entendida, la reacción inflamatoria se comportaría como cómplice de la carcinogénesis y/o de la progresión tumoral [252]. La actividad global MMP-9 del huésped podría contribuir a potenciar tanto la neovascularización como la invasión tumoral [270].

En resumen, existen resultados dispares a la hora de analizar el papel de MMP-2 y MMP-9 en el cáncer de vejiga. Muchos de los estudios publicados y citados en este trabajo no pueden ser comparados entre sí, ya que difieren ampliamente en la población a estudio (diferentes grados y estadios de la enfermedad), en las muestras sometidas a análisis (suero, células, orina y tejido) y en la metodología empleada. El análisis procedente de muestras de sangre tiene la ventaja de ser un buen marcador para la detección y evaluación de pronóstico, frente a las muestras procedentes de tejido; debido a la mínima invasividad del proceso de obtención y a que además proporciona información previa al tratamiento quirúrgico.

Por el contrario, los resultados del análisis pueden estar sujetos a error con mayor facilidad si la obtención y procesamiento de las muestras no se realiza de forma adecuada. MMP-9 presenta concentraciones séricas significativamente elevadas cuando la muestra se recoge en tubos con activador de coágulo. En la recogida de nuestras muestras de sangre empleamos tubos de plástico (tubos BD cat#366703) sin activador de coágulo que evitan la liberación de gelatinasas

durante la activación plaquetaria y que coagula a temperatura ambiente.

Desde luego que la presencia de metástasis o de células tumorales circulantes podría contribuir al aumento de expresión de gelatinasa en pacientes con tumores avanzados; sin embargo, esta circunstancia no justifica los hallazgos en controles sanos o en pacientes con neoplasia genuinamente superficial ( $T_a$ ). De hecho estos sujetos muestran también niveles detectables, lo que sugiere producción no neoplásica. Este hecho limita en gran medida la especificidad de este nuevo marcador.

Evidentemente, a pesar del cuerpo de evidencia en aumento, los resultados preliminares de este estudio deben ser tomados con precaución, debido al escaso tamaño de la muestra objeto de análisis, y han de corroborarse mediante estudios futuros que evalúen el papel de este marcador para el diagnóstico y la estadificación molecular del cáncer vesical pero con un tamaño ampliado de la serie a analizar, con mayor seguimiento, de carácter prospectivo y, deseablemente, multicéntrico y a gran escala. Solo de esta forma podrán validarse los hallazgos aquí obtenidos. De momento, la detección de gelatinasas en suero de paciente con cáncer, sobre todo si se tiene también en cuenta la expresión relativa de las mismas al inhibidor tisular TIMP-2, podrían resultar elementos prometedores, tanto en el diagnóstico no invasivo de la enfermedad como en la estadificación molecular de la misma.

## 6. CONCLUSIONES

1. LOS NIVELES SÉRICOS DE MMP-9 Y DE TIMP-2 SE ENCUENTRAN ELEVADOS EN PACIENTES CON CÁNCER CON RESPECTO A CONTROL. LA DETERMINACIÓN SÉRICA DE MMP-9 Y DE TIMP-2, ASÍ COMO DE SU RESPECTIVO COCIENTE (MMP-9/TIMP-2), PUEDEN EMPLEARSE COMO MARCADORES MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE CARCINOMA VESICAL.
2. TANTO MMP-9 COMO MMP-9/TIMP-2 PERMITEN DIFERENCIAR PACIENTES CON CÁNCER DE VESÍGULA DE INDIVIDUOS SANOS: 90% SENSIBILIDAD, 81% ESPECIFICIDAD PARA MMP-9  $>3,93$  ng/mL; 97% SENSIBILIDAD, 88% ESPECIFICIDAD PARA MMP-9/TIMP-2  $>0,053$ .
3. NIVELES SÉRICOS DE MMP-2 Y DEL COCIENTE MMP-2/TIMP-2 NO ESTABLECEN DIFERENCIAS ENTRE PACIENTES E INDIVIDUOS SANOS, POR LO QUE CARECEN DE UTILIDAD COMO MARCADORES DIAGNÓSTICO.
4. ALTOS NIVELES DE MMP-2 Y MMP-9 SE ASOCIAN A MAYOR INVASIÓN LOCAL (CATEGORÍA T) Y ALTOS NIVELES DE TIMP-2 SE ASOCIAN A ENFERMEDAD METASTÁSICA (CATEGORÍA M), LO QUE PERMITE PLANTEAR SU USO POTENCIAL PARA LA ESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD.
5. NO SE DEMUESTRA RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE PROTEÍNA EN SUERO DE NINGUNO DE LOS COMPUESTOS ANALIZADOS Y EL GRADO HISTOLÓGICO DEL TUMOR.
6. NIVELES SÉRICOS DE MMP-2, MMP-2/TIMP-2 Y MMP-9/TIMP-2 PREDICEN SUPERVIVENCIA CÁNCER ESPECÍFICA EN PACIENTES CON CÁNCER VESICAL.
7. NIVELES SÉRICOS DE MMP-2 Y MMP-2/TIMP-2 PREDICEN SUPERVIVENCIA LIBRE DE RECURRENCIA EN PACIENTES CON

## CÁNCER VESICAL NO MÚSCULO-INFILTRANTE.

8. NIVELES SÉRICOS DE MMP-2 DISCRIMINAN PACIENTES CON CÁNCER VESICAL NO MÚSCULO-INFILTRANTE Y MAYOR RIESGO DE PROGRESIÓN, AUNQUE SIN ALCANZAR SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.
9. TANTO NIVELES SÉRICOS DE PROTEÍNA (DETECTADOS POR TÉCNICAS DE ELISA) COMO DE ARNm (DETECTADOS MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL) DE MMP-2 Y MMP-9 SON MAYORES EN PACIENTES CON CÁNCER QUE EN CONTROLES, LO QUE AFIANZA LAS CONCLUSIONES PREVIAS 1-4 Y 6-8.
10. EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA ES POSIBLE MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA ESTUDIANDO NIVELES DE EXPRESIÓN DE MMP-2 Y MMP-9 CON RESPECTO A 18S MITOCONDRIAL.
11. LA ESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA ES POSIBLE MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA ESTUDIANDO NIVELES DE EXPRESIÓN DE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 CON RESPECTO A 18S MITOCONDRIAL.
12. LA EXPRESIÓN DE MMP-2 EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA SE RELACIONA MEJOR CON LA PROFUNDIDAD DE INVASIÓN, MIENTRAS QUE MMP-2, MMP-9 Y TIMP-2 CON LA PRESENCIA DE ENFERMEDAD METASTÁSICA.
13. EL ÍNDICE  $(MMP-9+MMP-2)-TIMP-2/(MMP-9+MMP-2)$  CALCULADO MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO REAL EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA AUMENTA LA CAPACIDAD DE DETECCIÓN Y DE ESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE LA

Paciente	Muestra	t	cistec- toma (I si, 2 no)	sexo (I hombre, 2 mujer)	edad (años)	T (0Ta, I T1, 2 T2, 3 T3, 4 T4, 9 no procede)	Grupos(I Ta,2T1,3 T2-4M0,4 M1,9 no procede)	M (I M1, 2 M0, 9 no pro- cede)	Grado (I G1, 2 G2, 3 G3, 9 no pro- cede)	MMP-2
33	95	CONTROL		1	60					75,56
12	63	CONTROL		1	61					62,46
16	71	CONTROL		2	58					91,9
17	72	CONTROL		1	62					140,46
18	73	CONTROL		1	49					110,18
19	75	CONTROL		1	61					101,09
20	76	CONTROL		2	59					94,84
26	85	CONTROL		1	46					50,5
31	90	CONTROL		1	58					81,59
32	94	CONTROL		1	49					100,17
22	80	CONTROL		1	78					139,66
8	59	CASO	2	1	50	0	1	2	3	107,59
9	60	CASO	2	1	74	0	1	2	2	94,01
10	61	CASO	2	1	77	0	1	2	1	99,74
14	65	CASO	2	1	69	0	1	2	3	105,37
30	89	CASO	2	1	56	0	1	2	2	82,75
36	98	CASO	2	2	31	0	1	2	1	49,58
41	103	CASO	2	2	52	0	1	2	3	98,2
1	49	CASO	1	2	77	1	2	2	3	113,761
2	50	CASO	2	1	49	1	2	2	2	105,05
4	52	CASO	2	1	48	1	2	2	2	59,69
6	55	CASO	2	1	54	1	2	2	3	64,64
7	56	CASO	2	1	57	1	2	2	3	83,64
11	62	CASO	2	1	66	1	2	2	2	108,55
35	97	CASO	2	1	69	1	2	2	2	112,88
42	105	CASO	2	1	66	1	2	2	3	132,04
5	54	CASO	1	2	46	2	3	2	3	101,38
13	64	CASO	2	1	67	2	3	2	3	98,81
15	67	CASO	1	1	73	2	4	1	3	76,28
21	77	CASO	2	1	53	2	3	2	3	109,96
27	86	CASO	2	1	44	2	3	2	3	43,14
29	88	CASO	1	1	53	2	3	2	3	183,16
38	100	CASO	2	1	63	2	3	2	3	60,48
25	84	CASO	1	1	68	3	3	2	3	69,63
34	96	CASO	1	1	58	3	4	1	3	136,88
40	102	CASO	1	1	71	3	3	2	3	118,95
24	83	CASO	1	1	79	3	3	2	3	109,72
3	51	CASO	1	1	44	4	4	1	3	164,41
23	81	CASO	2	1	67	4	4	1	3	120,01
28	87	CASO	2	1	64	4	3	2	3	125,94
37	99	CASO	1	1	49	4	4	1	3	147,03
39	101	CASO	2	1	63	4	3	2	3	200,53

MMP-9	TIMP-2	MMP-2/ TIMP-2	Recidiva (I si, 0 no, 9 no aplica)	Meses	Progre- sión (I si, 0 no, 9 no aplica)	Meses	Éxito (I si, 0 no, 9 no aplica)	Meses	Fecha de cirugía
4,1	68,56	1,1							
1,54	63,26	0,98							
0,41	74,55	1,23							
1,45	60,23	2,33							
1,19	58,55	1,88							
0,73	69,56	1,45							
1,64	49,48	1,91							
2,12	52,72	0,95							
1,58	52,19	1,56							
0,49	56,74	1,76							
3,91	89,19	1,56							
22,67	71,34	1,5	I	102	0		0		08/10/2004
4,84	65,8	1,42	0		I	33	I	39	08/11/2005
3,93	73,54	1,35	0		0		0		09/11/2005
3,39	58,66	1,79	0		0		0		22/11/2005
3,98	53,35	1,55	0		0		0		27/06/1905
4,01	52,53	0,94	I	68	0		0		25/08/2004
3,57	65,54	1,49	I	49	0		0		28/03/2006
7,37	85,1	1,33	0		0		0		04/10/2005
17,22	87,27	1,2	I	93	0		0		07/10/2005
21,76	62,99	0,94	I	13	0		0		14/10/2005
8,13	65,34	0,98	I	3	0		0		02/11/2005
34,53	55,76	1,28	0		I	15	I	24	02/11/2005
12,18	96,22	1,12	0		0		0		09/08/2005
11,38	76,92	1,46	I	56	0		0		27/06/2005
22,18	77,7	1,69	I	34	0		0		02/03/2005
20,4	59,53	1,7	0		I	8	I	8	20/04/2005
36	69	1,43	0		I	3	I	3	14/10/2005
9,4	69,76	1,09	0		0		0		22/11/2005
4,15	74,4	1,47	0		0		0		02/12/2005
16,6	63,58	0,67	I	16	0		0		16/12/2005
0,72	118,46	1,54	0		I	6	I	21	27/02/2006
6,61	53,93	1,12	I	31	0		0		13/01/2006
6,5	51,71	1,34	0		I	10	I	17	02/02/2006
4,28	75,56	1,81	0		I	7	I	13	11/04/2005
4,45	75,19	1,58	0		0		0		22/03/2006
27,33	67,39	1,62	0		I	3	I	3	11/10/2005
50,13	113,03	1,45	0		I	4	I	8	23/08/2005
14,94	84,05	1,42	0		I	6	I	12	22/11/2005
31	77,12	1,63	0		I	4	I	7	02/08/2005
11,99	89,58	1,64	0		I	3	I	3	04/03/2006
11,33	72,4	2,77	I	15	I	48	I	56	02/11/2004



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, et al. Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 2001;51:15-36.
2. Jemal A, Murray T, Samuels A, et al. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2003; 53:5-11.
3. Santos Arrontes D, Páez Borda A, Luján Galán M, et al. Genitourinary cancer incidence in a health geographic area of 300.000 people. Actas Urol Esp. 2004;28:646-9.
4. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program (Disponible en [www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov))
5. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin. 2000;50:7-13.
6. Kishi K, Hirota T, Matsumoto K, et al. Carcinoma of the bladder: A clinical and pathological analysis of 87 autopsy cases. J Urol 1981;125:36-40.
7. Messing EW. Bladder Cancer. "Campbell's Urology". 8ª Ed., volIV. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Wein AJ (Eds). WB Saunders, Philadelphia (USA). 2003.
8. National Center for Health Statistics: Health United States 1990. Hyattsville, MD, US DHHS, (DHHS publication number PHS 91-1232), 1991.
9. T Risch A, Wallace DMA, Sim E. Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. Human Mol Genet. 1995;4:231-5.
10. Horn EP, Tucker MA, Lambert G, et al. A study of gender-based cytochrome P450 1A2 variability: a possible mechanism for the male excess of bladder cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995;4:529-34.
11. Agency for Research on Cancer of the World Health Organization (WHO) (Disponible en <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>).



12. García Mediero JM, Pérez López JM, de Cabo Ripoll M, et al. Epidemiological characteristics of bladder tumors in the Cuenca area throughout a seventeen-year period. *Actas Urol Esp.* 2004;28:497-505.
13. Feldman AR, Kessler L, Myers MH, et al. The prevalence of cancer: Estimates based on the Connecticut Tumor Registry. *N Engl J Med.* 1986;315:1394-99.
14. Lynch CF, Cohen MB. Urinary system. *Cancer.* 1995;75 (suppl):316-20.
15. Angulo JC, López JI, Flores N, Toledo JD. Bladder carcinoma: I. Epidemiologic considerations in the Basque country. *Actas Urol Esp.* 1993;17:473-8.
16. World Health Organisation (WHO). GLOBOCAN 2008 (Disponible en <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2010/globocan2008.php>)
17. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). El cáncer en cifras- España 2013 (Disponible en <http://www.actasanitaria.com/filesset/>)
18. Kirby R, Fitzpatrick J, Kirby M, et al. A shared care for prostatic diseases. *ISIS Medical Media.* 1994.
19. Tablas de Mortalidad de la Población Española 1996-1997, Madrid 1999. (Disponible en <http://www.ine.es>).
20. Lee R y Droller M. Evolución natural del cáncer de vejiga. *Urol Clin North Am.* 2000;1:1-13.
21. Klemeney LA, Schoenberg M. Familial transitional cell carcinoma. *J Urol.* 1996;156:867-70.
22. Cole P, Hoover R, Friedell GH. Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer.* 1972;29:1250-54.
23. Silverman DT, Levin LI, Hoover RN, et al. Occupational risks of bladder cancer in the United States: I. White men. *J Natl Cancer Inst.*
24. Chapman JW, Connolly JG, Rosenbaum L. Occupational bladder cancer: A case-control study. In Connolly JG (ed): *Carcinoma of the Bladder.* New York, Raven Press, 1981: 45-9.

25. Rehn L. Blasengeschwulste bei fuchs in arbeiten. *Archiv Klin Chir.* 1895;50:588-600.
26. Wallace DMA. Occupational urothelial cancer. *Br J Urol.* 1988;61:175-82.
27. Ferrís J, García J, Berbel O, et al. Constitutional and occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas Urol Esp.* 2013;37:513-22.
28. Wynder EL, Goldsmith R. The epidemiology of bladder cancer. *Cancer.* 1977;40:1246-9.
29. Thompson I.M., Peek M., Rodriguez F. The impact of cigarette smoking on stage, grade and number of recurrences of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1987;137: 401-4.
30. Raitanen MP, Nieminen P, Tammela TLJ. Impact of tumours grade, stage, number, size, smoking and sex on survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol.* 1995;76: 470-4 .
31. Risch A, Wallace DMA, Sim E. Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Human Mol Genet.* 1995;4:231-4.
32. El-Bolkainy MN, Mokhtar NM, Ghoneim MA, et al. The impact of schistosomiasis on the pathology of bladder carcinoma. *Cancer.* 1981;48:2643-5.
33. LaRue H, Simoneau M, Fradet Y. Human papillomavirus in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res.* 1995;1:435-9.
34. Aynaud O, Tranbloc P, Orth G. Lack of evidence for a role of human papillomavirus in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1998;159:86-9.
35. Ferrís J, Berbel O, Alonso-López J, et al. Environmental non-occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas Urol Esp.* 2013 Apr 22. (Epub ahead of print).
36. Vlaovic R, Jewett AS. Cyclophosphamide induced bladder cancer. *Can J Urol.* 1999;6:745-9.

37. Cohen SM, Garland EM, St. John M, et al. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 1992;52:3577-9.
38. Pedersen-Bjergaard J, Ersboll J, Hansen VL, et al. Carcinoma of the bladder after treatment with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1988;318:1028-31.
39. Arias E, Astudillo P, Manterola C, et al. Segunda neoplasia tras el tratamiento del cáncer de próstata localizado. *Actas Urol Esp.* 2012;36:583-9.
40. Smith JA Jr, Whitmore WF Jr. Regional lymph node metastasis from bladder cancer. *J Urol.* 1981;126:591-602.
41. Holmang S, Hedelin H, Andersson C, et al. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol.* 1995;153:1823-6.
42. Oyasu R. World Health Organization and International Society of Urological Pathology Classification and two number grading system of bladder tumors. *Cancer.* 2000;88:1509-12.
43. Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Hematuria home screening: Repeat testing results. *J Urol.* 1995;154:57-61.
44. Van der Poel HG, Hessels D, Van Leenders GJLH, et al. Multi-focal transitional cell cancer and p53 mutation analysis. *J Urol.* 1998;160:124-30.
45. Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, et al. Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. *Cancer Res.* 1998;58:5835-9.
46. Lee E, Schwabold H, Fradet Y, et al. Tumor-associated antigen in normal mucosa of patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1997;157:1070-3.
47. Pan Y, Wang N, Tribukait B, et al. Chromosome aberrations in normal looking mucosa is related to changes in papillary bladder cancer. *J Urol.* 2000;163(suppl):548-50.
48. Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, et al. A Combined Analysis of European

Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council Randomized Clinical Trials for the Prophylactic Treatment of Stage TaT1 Bladder Cancer. *J Urol*. 1996;156:1934-9.

49. Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology*. 1995;45:387-91.
50. Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, et al. Guidelines on Bladder Cancer. European Association of Urology. *Eur Urol*. 2002;41:105-12.
51. Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential. Clinical and biologic implications. *Cancer*. 1999;86:2102-6.
52. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium: efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer*. 1989;64:2448-51.
53. Harker WG, Meyers FJ, Freiha FS, et al. Cisplatin, methotrexate, and vinblastine (CMV): an effective chemotherapy regimen for metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract. A Northern California Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 1985;3:14636.
54. Raghavan D, Shipley WU, Garnick MB, et al. Biology and management of bladder cancer. *N Engl J Med*. 1990;322:1129-34.
55. Geller NL, Sternberg CN, Penenberg D, et al. Prognostic factors for survival of patients with advanced urothelial tumors treated with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy. *Cancer*. 1991;67:1525-30.
56. Oliver RT. Bladder cancer chemotherapy: is response of squamous tumours different to that of transitional cell tumours? *Ann Oncol*. 1991;2:87-92.
57. Babaian RJ, Johnson DE, Llamas L, et al. Metastases from transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urology*. 1980;16:142-5.

58. Amit Gupta, Yair Lotan, Shahrokh F Shariat, et al. Lymphovascular invasion independently predicts increased risk of distant recurrence and decreased overall survival in patients with transitional cell carcinoma (TCC). *J Urol*. 2004;171:79-86.
59. Loehrer PJ, Einhorn LH, Elson PJ, et al. A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma. A cooperative group study. *J Clin Oncol*. 1992;10:1066-9.
60. Cookson MS, Herr HW, Zhang Z, et al. The treated natural history of high risk superficial bladder cancer: 15-year outcome. *J Urol*. 1997;158:62-5.
61. Herr HW. Tumour progression and survival in patients with T1G3 bladder tumours: 15 year outcome. *Br J Urol*. 1997;80: 762-5.
62. Wiesner C, Pfitzenmaier J, Gillitzer R, et al. Lymph node metastases at radical cystectomy for superficial bladder cancer. *J Urol*. 2004;171:78-86.
63. Stein JP, Esrig D, Freeman JA, et al. Prospective pathology analysis of female cystectomy specimens: risk factors for orthotopic diversion in women. *Urology*. 1998;51:951-5.
64. Soloway MS, Lopez AE, Patel J et al. Results of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder and the effect of chemotherapy. *Cancer*. 1994;73:1926-31.
65. Pagano F, Bassi P, Galetti TP, et al. results of contemporary radical cystectomy for invasive bladder cancer: a clinicopathological study with an emphasis on the inadequacy of the tumor, nodes and metastases classification. *J Urol*. 1991;145:45-50.
66. Wishnow KI and Tenney DM. Will Rogers and the results of radical cystectomy for invasive bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 1991;18:529-37.
67. Bassi P, Ferrante GD, Piazza N, et al. Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort. *J Urol*. 1999;161:1494-7.
68. Fleshner NE, Herr HW, Stewart AK, et al. The National database report on bladder carcinoma. *Cancer*. 1996;78:1505-13.

69. Herr HW. Uncertainty, stage and outcome of invasive bladder cancer (editorial). *J Urol*. 1994;152:401-2.
70. Herr HW and Donat SM. Outcome of patients with grossly node positive bladder cancer after pelvic lymph node dissection and radical cystectomy. *J Urol*. 2001;165:62-4.
71. Gospodarowicz MK and Warde PR. A critical review of the role of definitive radiation therapy in bladder cancer. *Semin Urol*. 1993;11:214-26.
72. Wajzman Z. Is there a role for radiation therapy in the treatment of invasive bladder cancer? *J Urol*. 1997;157:1647-8.
73. Stuschke M and Thames HD. Hyperfractionated radiotherapy of human tumors: overview of the randomized clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997;37:259-67.
74. Horwich A, Pendlebury S and Dearnaley DP. Organ conservation in bladder cancer. *Eur J Cancer*. 1995;31:208-12.
75. Hall RR, Roberts JT and Marsh MM. Radical TUR and chemotherapy aiming at bladder preservation. *Prog Clin Biol Res*. 1990;353:163-8.
76. Herr HW. Conservative management of muscle-infiltrating bladder cancer: prospective experience. *J Urol*. 1987;138:1162-3.
77. Henry K, Miller J, Mori M, et al. Comparison of transurethral resection to radical therapies for stage B bladder tumors. *J Urol*. 1988;140:964-7.
78. Papanicolaou G N and Marshall VF. Urine sediment smears as a diagnostic procedure in cancers of the urinary tract. *Science*. 1945;101:519-20.
79. Trott PA and Edwards L. Comparison of bladder washings and urine cytology in the diagnosis of bladder cancer. *J Urol*. 1973;110:664-6.
80. Hemmingsen L, Rasmussen F, Skaarup P, et al. Urinary protein profiles in patients with urothelial bladder tumours. *Br J Urol*. 1981;53:324-9.
81. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, et al. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology*. 2005;66(Suppl 1):90-107.

82. Gamarra MC and Zein T. Cytologic spectrum of bladder cancer. *Urology*. 1984;23:23-6.
83. Zein T, Wajzman Z, Englander LS, et al. Evaluation of bladder washings and urine cytology in the diagnosis of bladder cancer and its correlation with selected biopsies of the bladder mucosa. *J Urol*. 1984;132:670-1.
84. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, et al. Hexvix PCB301/01 Study Group. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J Urol*. 2004;171:135-8.
85. Jichlinski P, Guillou L, Karlsen SJ, et al. Hexylaminolevulinate fluorescence cystoscopy: a new diagnostic tool for photodiagnosis of superficial bladder cancer a multicenter study. *J Urol*. 2003;170:226-9.
86. Hungerhuber E, Stepp H, Kriegmair M, et al. Seven years experience with 5-aminolevulinic acid in detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2007;69:260-4.
87. Matzkin H, Soloway MS, Hardeman S. Transitional cell carcinoma of the prostate. *J Urol*. 1991;146:1207-12.
88. Mungan MU, Canda AE, Tuzel E, et al. Risk factors for mucosal prostatic urethral involvement in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2005;48(5):760-3.
89. Brausi M, Collette L, Kurth K, et al. EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Collaborative Group. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol*. 2002;41:523-31.
90. Miladi M, Peyromaure M, Zerbib M, et al. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumours. *Eur Urol*. 2003;43:241-5.
91. Jahnson S, Wiklund F, Duchek M, et al. Results of secondlook resection after primary resection of T1 tumour of the urinary bladder. *Scand J Urol Nephrol*. 2005;39:206-10.

92. Jewett HJ and Strong GH. Infiltrating carcinoma of the bladder: relation of depth of penetration of the bladder wall to incidence of local extension and metastasis. *J Urol.* 1944;55: 366.
93. UICC International Union Against Cancer. TNM Classification of malignant tumours. 7th edition. 2009.
94. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, et al. The World Health Organization/ International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol.* 1998;22: 1435-48.
95. Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of classification of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press, 2004:29-34.
96. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur Urol.* 2004;46: 170-6.
97. Wright JL, Lin DW, Porter MP. The association between extent of lymphadenectomy and survival among patients with lymph node metastases undergoing radical cystectomy. *Cancer.* 2008;112:2401-8.
98. Barentsz JO, Witjes AM, Ruijs SHJ. What is new in bladder cancer imaging? *Urol Clin North Am.* 1997;24:583-602.
99. Spencer J, Lindsell D, Mastorakou I. Ultrasonography in the investigation of adults with haematuria. *BMJ.* 1990;301:1074-76.
100. Hall TB, MacVicar AD. Imaging of bladder cancer. *Imaging.* 2001;13:1-10.
101. Palou J, Rodriguez-Rubio F, Huguet J, et al. Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumors. *J Urol.* 2005;174:859-61.
102. Kim KJ, Park SY, Ahn HJ, et al. Bladder cancer: analysis of multidetector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging. *Radiology.* 2004;231:725-31.



103. Sager EM, Talle K, Fossa S, et al. The role of CT in demonstrating perivesical tumor growth in the preoperative staging of carcinoma of the urinary bladder. *Radiology*. 1983;146:443-6.
104. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Bladder cancer v.1.2011.
105. Lista F, Andrés G, Cáceres F, et al. Evaluación del riesgo de invasión muscular, afectación perivesical y/o ganglionar mediante resonancia nuclear magnética balanceada con difusión (MRI-DW) en el paciente candidato a cistectomía radical. *Actas Urol Esp*. 2013;37:419-24.
106. Oleaga L. Magnetic Resonance staging of invasive urinary bladder cancer. *Urol Integr Invest*. 2003;8:161-6.
107. Siegelman ES, Schnall MD. Contrast-enhanced MR imaging of the bladder and prostate. *MRI Clin North Am*. 1996;4:153-69.
108. Amendola MA, Glazer GM, Grossman HB, et al. Staging of bladder carcinoma: MRI-CT-Surgical correlation. *AJR*. 1986;146:1179-83.
109. Persad R, Kabala J, Gillat D, et al. Magnetic Resonance Imaging in the staging of bladder cancer. *Br J Urol*. 1993;71:566-73.
110. Teeger S, Sica GT. MR imaging of bladder diseases. *MRI Clin North Am* 1996;4:565-81.
111. Barentsz JO, Jager GJ, Witjes AM. MR imaging of the urinary bladder. *MRI Clin North Am*. 2000;8:853-67.
112. Lammle M, Beer A, Settles M. Reliability of MR imaging-based virtual cystoscopy in the diagnosis of cancer of the urinary bladder. *AJR*. 2002;178:1483-8.
113. Barentsz JO, Engelbrecht M, Jager GJ, et al. A. Fast dynamic gadolinium-enhanced MR imaging of urinary bladder and prostate cancer. *J. Magn. Reson. Imaging*. 1999;10:295-304.
114. Kim B, Semelka RC, Ascher SM, et al. Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1 and T2 Weighted MR imaging, dynamic gadolinium-enhanced imaging and late gadolinium-enhanced imaging. *Radiology*. 1994;193:239-45.

115. Narumi Y, Kadota T, Inoue E, et al. Bladder tumors: staging with gadolinium-enhanced oblique MR imaging. *Radiology*. 1993;187:145-50.
116. Tachibana M, Baba S, Deguchi N, et al. Efficacy of gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging for differentiation between superficial and muscle invasive tumor of the bladder: a comparative study with computerized tomography and transurethral ultrasonography. *J Urol*. 1991;145:1169-73.
117. Tanimoto A, Yuasa Y, Imai Y, et al. Bladder tumor staging: comparison of conventional and gadolinium-enhanced dynamic MR imaging and CT. *Radiology*. 1992;185:741-7.
118. Barentsz JO, Jager GJ, Van Vierzen PBJ, et al. Staging urinary bladder cancer after transurethral biopsy: value of fast dynamic contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*. 1996;201:185-93.
119. Barentsz JO, Ruijs SHJ, Strijk SP. The role of MR imaging in carcinoma of the urinary bladder. *AJR*. 1993;160:937-47.
120. Barentsz JO, Berger-Hartog O, Witjes JA, et al. Evaluation of chemotherapy in advanced urinary bladder cancer with fast dynamic contrast enhanced MR imaging. *Radiology*. 1998;207:791-7.
121. Macvicar AD. Bladder cancer staging. *BJU International*. 2000; 86(Suppl)1:11-122.
122. Braendengen M, Winderen M, Fosså SD. Clinical significance of routine pre-cytectomy bone scans in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Br J Urol*. 1996;77:36-40.
123. Brismar J, Gustafson T. Bone scintigraphy in staging bladder carcinoma. *Acta Radiol*. 1988;29:251-2.
124. Lauenstein TC, Goehde SC, Herborn CU, et al. Whole-body MR imaging: evaluation of patients for metastases. *Radiology*. 2004;233:139-48.
125. Schmidt GP, Schoenberg SO, Reiser MF, et al. Whole-body MR imaging of bone marrow. *Eur J Radiol*. 2005;55:33-40.

126. Heicappell R, Muller-Mattheis V, Reinhardt M, et al. Staging of pelvic lymph nodes in neoplasms of the bladder and prostate by positron emission tomography with 2-[(18)F]-2-deoxy-D-glucose. *Eur Urol.* 1999;36:582-7.
127. Fidler IJ, Balch CM. The biology of cancer metastasis and implications for therapy. *Curr. Probl Surg.* 1987;24:129-209.
128. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science.* 1977;217:893-5.
129. Fidler IJ. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:1588-92.
130. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med.* 1971;285:1182-6.
131. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991;64:327-36.
132. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249-57.
133. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science.* 1998;279:377-80.
134. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13:9-22.
135. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989;246:1306-9.
136. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 1999;237:97-132.
137. Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359:843-5.

138. Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol.* 1993;143:1255-62.
139. Fauconnet S, Lascombe I, Chabannes E, et al. Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells. *J Biol Chem.* 2002;277:23534-43.
140. Chodak GW, Hospelhorn V, Judge SM, et al. Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney cancer. *Cancer Res.* 1988;48:2083-8.
141. Allen LE, Maher PA. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in an invasive bladder carcinoma cell line. *J Cell Physiol.* 1993;155:368-75.
142. Miyake H, Yoshimura K, Hara I, et al. Basic fibroblast growth factor regulates matrix metalloproteinases production and in vitro invasiveness in human bladder cancer cell lines. *J Urol.* 1997;157:2351-5.
143. Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M, et al. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res.* 1998;58:1298-304.
144. Inoue K, Slaton JW, Karashima T, et al. The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4866-73.
145. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science.* 1982;217:998-1003.
146. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest.* 1983;49:636-49.
147. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, et al. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest.* 1983;49:140-7.
148. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 1987;48:549-54.

149. Rao CN, Castronovo V, Schmitt MC, et al. Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor. *Biochemistry*. 1989;28:7476-86.
150. Liotta LA, Abe S, Robey PG, et al. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci EEUU*. 1979;76: 2268-72.
151. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 1980;284:67-8.
152. Guirguis R, Margulies I, Taraboletti G, et al. Cytokine-induced pseudopodial protrusion is coupled to tumour cell migration. *Nature*. 1987;329:261-3.
153. Luna EJ, Condeelis JS. Actin-associated proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Genet*. 1990;11:328-32.
154. Liotta LA. Mechanisms of cancer invasion and metastasis. *Important Adv Oncol*. 1985;28-41.
155. Ostrowski LE, Finch J, Krieg P, et al. Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumor progression. *Mol Carcinog*. 1988;1:13-9.
156. Templeton NS, Brown PD, Levy AT, et al. Cloning and characterization of human tumor cell collagenase. *Cancer Res*. 1990;50:5431-7.
157. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 1980;284:67-8.
158. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*. 2000;6:149-56.
159. Inoue K, Slaton JW, Perrotte P, et al. Interleukin-8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res*. 2000;60:2290-9.

160. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, et al. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*. 1998;92:391-400.
161. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*. 1998;58:1048-51.
162. Wilhelm SM, Collier IE, Kronberger A, et al. Human skin fibroblast stromelysin: structure, glycosylation, substrate specificity, and differential expression in normal and tumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci EEUU*. 1987;84:6725-9.
163. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Steeg PS. Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest*. 1991;9:543-51.
164. Salowe SP, Marcy AI, Cuca GC, et al. Characterization of zinc-binding sites in human stromelysin-1: stoichiometry of the catalytic domain and identification of a cysteine ligand in the proenzyme. *Biochemistry*. 1992;31:4535-40.
165. Bode W, Reinemer P, Huber R, et al. The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *Embo J*. 1994;13:1263-9.
166. Massova I, Kotra LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J*. 1998;12:1075-95.
167. Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, et al. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res*. 1987;47:4869-76.
168. Nakajima M, Lotan D, Baig MM, et al. Inhibition by retinoic acid of type IV collagenolysis and invasion through reconstituted basement membrane by metastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 1989;49:1698-706.
169. Matrisian LM, Bowden GT. Stromelysin/transin and tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 1990;1:107-15.
170. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J*. 1991;5:2145-54.

171. Nagase H, Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-4.
172. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, et al. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* 1999;284:1667-70.
173. Gioia M, Monaco S, Fasciglione GF, et al. Characterization of the mechanisms by which gelatinase A, neutrophil collagenase, and membrane-type metalloproteinase MMP-14 recognize collagen I and enzymatically process the two alpha-chains. *J Mol Biol.* 2007;368:1101-3.
174. Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. *Cancer Res.* 2010;70:2224-34.
175. Offersen BV, Knap MM, Horsman MR, et al. Matrix metalloproteinase-9 measured in urine from bladder cancer patients is an independent prognostic marker of poor survival. *Acta Oncol.* 2010;49:1283-7.
176. Min C, Eddy SF, Sherr DH, et al. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem.* 2008;104:733-44.
177. Wågsäter D, Zhu C, Björkegren J, et al. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the *Ldlr(-/-)Apob(100/100)* mouse. *Int J Mol Med.* 2011;28:247-53.
178. Linask KK, Han M, Cai DH, et al. Cardiac morphogenesis: matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionality of looping. *Dev Dyn.* 2005;233:739-53.
179. Fainardi E, Castellazzi M, Tamborino C, et al. Potential relevance of cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal synthesis of active matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as markers of disease remission in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2009;15:547-54.
180. Van Vollenhoven RF. Unresolved issues in biologic therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7:205-15.

181. Chen EI, Li W, Godzik A, et al. A residue in the S2 subsite controls substrate selectivity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem.* 2003;278:17158–63.
182. Rosenblum G, Meroueh S, Toth M, et al. Molecular structures and dynamics of the stepwise activation mechanism of a matrix metalloproteinase zymogen: challenging the cysteine switch dogma. *J Am Chem Soc.* 2007;129:13566–74.
183. Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie.* 2005;87:287–97.
184. Zijlstra A, Seandel M, Kupriyanova TA, et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood.* 2006;107:317-27.
185. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent activities. *Sci Signal.* 2008;1:re6.
186. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, et al. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am J Pathol.* 1990;136:585-92.
187. D'Errico A, Garbisa S, Liotta LA, et al. Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod Pathol.* 1991;4:239-46.
188. Davies B, Miles DW, Happerfield LC, et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer.* 1993;67:1126-31.
189. Stearns ME, Wang M. Type IV collagenase (M(r) 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res.* 1993;53:878-83.
190. Boag AH, Young ID. Increased expression of the 72-kd type IV collagenase in prostatic adenocarcinoma. Demonstration by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Am J Pathol.* 1994;144:585-91.
191. Upadhyay J, Shekarriz B, Nemeth JA, et al. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-2 immunolocalization in human



- prostate: change in cellular localization associated with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res.* 1999;5:4105-10.
192. Autio-Harmainen H, Karttunen T, Hurskainen T, et al. Expression of 72 kilodalton type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. *Lab Invest.* 1993;69:312-21.
  193. Davies B, Waxman J, Wasan H, et al. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* 1993;53:5365-9.
  194. Grignon DJ, Sakr W, Toth M, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1996;56:1654-9.
  195. Bianco FJ Jr, Gervasi DC, Tiguert R, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. *Clin Cancer Res.* 1998;4 3011-6.
  196. Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE. Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Easier said than done? *Arthritis Rheum.* 1994;37:1115-26.
  197. Karran EH, Young TJ, Markwell RE, et al. In vivo model of cartilage degradation-effects of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Ann Rheum Dis.* 1995;54:662-9.
  198. Taraboletti G, Garofalo A, Belotti D, et al. Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:293-8.
  199. Watson SA, Morris TM, Robinson G, et al. Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models. *Cancer Res.* 1995;55:3629-33.
  200. Brown S, Bernardo MM, Li ZH, et al. Potent and selective mechanism-based inhibition of Gelatinases. *J Am Chem Soc.* 2000;122:6799-800.
  201. Montironi R, Lopez-Beltran A, Mazzucchelli R, et al. Classification and grading of the non-invasive urothelial neoplasms: recent advances and controversies. *J Clin Path.* 2003;56:91-5.

202. Dalbagni G, Presti J, Reuter V, et al. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet*. 1993;324:469-71.
203. Raj GV, Moreno JC, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer*. 1998;82:1419-42.
204. Pantel K, von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr. Opin. Oncol*. 2000;12:95-101.
205. Gazzaniga P, Gandini O, Giuliani L, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood. A new marker of circulating neoplastic cells in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001;7:577-83.
206. Sauter G, Haley J, Chew K, et al. Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor proliferation in bladder cancer. *Int J Cancer*. 1994;57:505-14.
207. Krupski T, Moskaluk C, Boyd JC, et al. A prospective pilot evaluation of urinary and immunohistochemical markers as predictors of clinical stage of urothelial carcinoma of the bladder. *BJU Int*. 2000;85:1027-32.
208. Bue P, Wester K, Sjostrom A, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in urinary bladder cancer metastases. *Int J Cancer*. 1998;76:189-93.
209. Leyh H, Marberger M, Conort P, et al. Comparison of BTA Stat test with voided urine cytology and bladder wash cytology in the diagnosis and monitoring of bladder cancer. *Eur Urol*. 1999;35:52-6.
210. Thomas L, Leyh H, Marberger M, et al. Multicenter trial of the quantitative BTATRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem*. 1999;45:472-7.
211. Serretta V, Lo Presti D, Vasile P, et al. Urinary NMP22 for the detection of recurrence after transurethral resection of transitional cell carcinoma of the bladder: experience on 137 patients. *Urology*. 1998;52:793-6.
212. Fradet Y, Lockhart C. Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: Immunocyt, trademark. *Can J Urol*. 1997;4:400-5.

213. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol*. 2000;163:348-56.
214. Mourah S, Cussenot O, Vimont V, et al. Assessment of microsatellite instability in urine in the detection of transitional-cell carcinoma of the bladder. *Int J Cancer*. 1998;79:629-33.
215. Muller M, Krause H, Heicappell R. Comparison of human telomerase RNA and telomerase activity in urine for diagnosis of bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 1998;4:1949-54.
216. Andrés G, Ashour N, Sánchez-Chapado M, et al. El estudio de la metilación del ADN en el cáncer urológico: presente y futuro. *Actas Urol Esp*. 2013;37:368-75.
217. Mengual L, Burset M, Ribal MJ, et al. Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2624-33.
218. Marin-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, et al. Utility of urothelial mRNA markers in blood for staging and monitoring bladder cancer. *Urology*. 2012;79:240.e9-15.
219. Wu X, Kakehi Y, Zeng Y, et al. Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20. *J Urol*. 2005;174:2138-42.
220. Kurahashi T, Hara I, Oka N, et al. Detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients undergoing radical cystectomy for locally invasive bladder cancer by real-time reverse transcriptase-PCR for cytokeratin 19 and uroplakin II. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3773-7.
221. Gazquez C, Ribal MJ, Marin-Aguilera M. Biomarkers vs conventional histological analysis to detect lymph node micrometastases in bladder cancer: a real improvement? *BJU Int*. 2012;110:1310-6.
222. Dawson-Saunders B, Trapp RG. *Bioestadística Médica*. 2ª ed. México: Editorial el Manual Moderno, 1996.

223. Milton JS, Tsokos JO. Estadística para biología y ciencias de la salud. Madrid: Interamericana McGraw Hill, 2001.
224. Martín Andrés A, Luna del Castillo JD. Bioestadística para las ciencias de la salud. 4ª ed. Madrid: NORMA, 1993.
225. Jenicek M, Clèroux R. Epidemiología. Principios. Técnicas. Aplicaciones. Barcelona: Salvat, 1987.
226. Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. Med Clin. 1995;104:661-70.
227. Rebasa P. Conceptos básicos del análisis de supervivencia. Cir Esp. 2005;78:222-30.
228. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. Methods. 2001;25:402-8.
229. Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinoma. J Urol. 1999;161:1359-63.
230. Margulies IM, Hoyhtya M, Evans C, et al. Urinary type IV collagenase: elevated levels are associated with bladder transitional cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1992;1:467-74.
231. Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, et al. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. Cancer Res. 1996;56:3196-8.
232. Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, et al. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. Cancer Res. 1998;58:1395-9.
233. Gohji K, Fujimoto N, Ohkawa J, Fujii A, Nakajima M. Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. Br J Cancer. 1998;77:650-5.

234. Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, et al. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer*. 1998;82:1359-66.
235. Hamasaki T, Hattori T, Kimura G, et al. Tumor progression and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) mRNA by human urinary bladder cancer cells. *Urol Res*. 1998;26:371-6.
236. Furukawa A, Tsuji M, Nishitani M, et al. Role of the matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase families in non-invasive and invasive tumors transplanted in mice with severe combined immunodeficiency. *Urology*. 1998;51:849-53.
237. Kanda K, Takahasi M, Murakami Y, et al. The role of the activated form of matrix-metalloproteinase-2 in urothelial cancer. *Br J Urol Int*. 2000;86:553-7.
238. Monier F, Mollier S, Guillot M, et al. Urinary release of 72 and 92 kDa Gelatinases, TIMP-2, N-GAL and conventional prognostic factors in urothelial carcinomas. *Eur Urol*. 2002;42:356-63.
239. Guan K, Ye H, Yan Z, et al. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2003;61:719-23.
240. Eissa S, Labib RA, Mourad S, et al. Comparison of telomerase activity and matrix metalloproteinase-9 in voided urine and bladder wash samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Eur Urol*. 2003;44: 687-94.
241. Gakiopoulou H, Nakopoulou L, Siatelis A, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clinical Cancer Res*. 2003;9:5573-81.
242. Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, et al. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2576-82.

243. Vasala K, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. *Urology*. 2003;62:952-7.
244. Sumi T, Yoshida H, Hyun Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncology Reports*. 2003;10:345-9.
245. Chaffer CL, Dopheide B, McCulloch DR, et al. Upregulated MT1-MMP/TIMP-2 axis in the TSU-Pr1-B1/B2 model of metastatic progression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Exper Metastases*. 2005;22:115-25.
246. Vasala K, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and matrix metalloproteinase-2 in complex with the inhibitor (MMP-2:TIMP-2) as prognostic markers in bladder cancer. *Clin Biochem*. 2007;40:640-4.
247. Vasala K, Kuvaja P, Turpeenniemi-Hujanen T. Low circulating levels of proMMP-2 are associated with adverse prognosis in bladder cancer. *Tumour Biol*. 2008;29:279-86.
248. Fernández CA, Wszolek MF, Loughlin KR, et al. A novel approach to using matrix metalloproteinases for bladder cancer. *J Urol*. 2009;182:2188-94.
249. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*. 2011;13:534-40.
250. Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, et al. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012;33:119-208.
251. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*. 2010;20:161-8.
252. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LY. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 2002;295:2387-92.

253. Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, et al. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer*. 1998; 82:1359–66.
254. Xu X, Wang Y, Chen Z, et al. Matrix metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen. *Cancer Res*. 2005;65:130–6.
255. Angulo JC, Lopez JI, Grignon DJ, Sanchez-Chapado M. Muscularis mucosa differentiates two populations with different prognosis in stage T1 bladder cancer. *Urology*. 1995; 45:47–53.
256. Grimm MO, Modlich O, Brosius U, et al. Expression and progression pattern of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2000;4:557–62.
257. Rodríguez-Faba O, Fernández JM, Palou J, et al. Significance of collagenase 3 (Matrix Metalloproteinase 13) in invasive bladder cancer: correlation with pathological parameters. *Urol Int*. 2007;78:140–144.
258. Rodríguez-Faba O, Palou J, Fernández JM, et al. Matrix metalloproteinases and bladder cancer: What is new? *ISRN Urol*. 2012;2012:531–9.
259. Nutt JE, Mellon JK, Qureshi K, et al. Matrix metalloproteinase-1 is induced by epidermal growth factor in human bladder tumour cell lines and is detectable in urine of patients with bladder tumours. *Br J Cancer*. 1998;78:215–20.
260. Di Carlo A, Terracciano D, Mariano A, et al. Urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) in human bladder tumors. *Oncol Rep*. 2006;15:1321–6.
261. Szarvas T, Singer BB, Becker M, et al. Urinary matrix metalloproteinase-7 level is associated with the presence of metastasis in bladder cancer. *BJU International*. 2011;107:1069–73.
262. Naruo S, Kanayama H, Takigawa H, et al. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *Int J Urol*. 1994;1:228–31.
263. Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, et al. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Res*. 1996;56:3196–8.

264. Stankovic S, Konjevic G, Gopcevic K, et al. Activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of breast cancer patients. *Pathology-Research and Practice*. 2010;206:241-7.
265. Patel S, Sumitra G, Koner BC. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. *Clin Biochem*. 2011;44:869-72.
266. Angulo JC, Ferruelo A, Rodríguez-Barbero JM, et al. Detección y estadificación molecular del cáncer vesical mediante RT-PCR a tiempo real para gelatinasas (MMP-2 MMP-9) y TIMP-2 en sangre periférica. *Actas Urol Esp*. 2011;35:127-36.
267. Ramón de Fata F, Ferruelo A, Andrés G. El papel de la metaloproteinasa de la matriz MMP-9 y del inhibidor tisular de metaloproteinasa TIMP-2 como marcadores séricos de cáncer vesical. *Actas Urol Esp*. 2013;37:480-8.
268. López JI. Comentario a: Detección y estadificación molecular 523 del cáncer vesical mediante RT-PCR a tiempo real para gelatinasas (MMP-2, MMP-9) y TIMP-2 en sangre periférica. *Actas Urol Esp*. 2011;35:137.
269. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, et al. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:121-31.
270. Masson V, de la Ballina LR, Munaut C, et al. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J*. 2005;19:234-6.



**ANEXO I. Publicación Actas Urol Esp 2011; 35:127-36.**





## ARTÍCULO ORIGINAL

### Detección y estadificación molecular del cáncer vesical mediante RT-PCR a tiempo real para gelatinasas (MMP-2, MMP-9) y TIMP-2 en sangre periférica

J.C. Angulo\*, A. Ferruelo, J.M. Rodríguez-Barbero, C. Núñez, F.R. de Fata y J. González

Servicio de Urología, Hospital Universitario de Getafe, Universidad Europea de Madrid, Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de Getafe, Servicio Madrileño de Salud, Madrid, España

Recibido el 26 de septiembre de 2010; aceptado el 25 de octubre de 2010

Accesible en línea el 18 de febrero de 2011

#### PALABRAS CLAVE

Neoplasia vesical;  
Estadificación  
molecular;  
RT-PCR;  
MMP-2;  
MMP-9;  
TIMP-2

#### Resumen

**Introducción:** La estadificación molecular del cáncer vesical basada en la detección de ARNm de genes específicos de urotelio no ha sido concluyente. Analizamos si la evaluación de gelatinasas (MMP-9, MMP-2) y TIMP-2 en sangre periférica mediante RT-PCR a tiempo real permite diagnosticar y caracterizar pacientes con neoplasia vesical.

**Material y método:** Se ha extraído ARN total a partir de células sanguíneas circulantes en 42 individuos (11 controles sanos, 31 pacientes con cáncer vesical en diversos estadios) y se ha llevado a cabo RT-PCR a tiempo real empleando cebadores específicos para MMP-9, MMP-2, TIMP-2 y 18S ribosomal. Los valores de cuantificación del ARNm se describen como relativos a ARNm 18S (método  $\Delta\Delta Ct$  comparativo) y los resultados se comparan de forma ciega con los datos obtenidos mediante diagnóstico histológico y estadificación clínica.

**Resultados:** Los niveles normalizados de ARNm de MMP-9 y MMP-2 son más altos en pacientes con cáncer que en controles ( $1,82 \pm 0,6$  veces y  $2,7 \pm 0,6$  veces, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Los pacientes con enfermedad metastática también tienen niveles mayores de ARNm de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 ( $9,6 \pm 0,20$  veces,  $5,22 \pm 0,26$  veces y  $1,97 \pm 0,22$  veces, respectivamente;  $p < 0,05$ ). MMP-9 y MMP-2 también se asocian con estadio clínico y grado avanzado ( $p < 0,05$ ). Se propone un índice entre variables que aumenta la habilidad para segregar pacientes con tumores T<sub>a</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>-4M0 y T<sub>2</sub>-4M1.

**Conclusiones:** La identificación de tumor vesical y la estadificación molecular de la enfermedad resulta posible mediante la detección de gelatinasas y TIMP-2 en sangre periférica empleando RT-PCR a tiempo real. La capacidad de distinguir enfermedad metastática es mayor para MMP-9, pero MMP-2 discrimina mejor los niveles de invasión tumoral. La investigación futura en este campo podría aportar resultados prometedores en la evaluación molecular de la neoplasia vesical.

© 2010 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jangulo@futurnet.es](mailto:jangulo@futurnet.es), [jangulo.hugf@salud.madrid.org](mailto:jangulo.hugf@salud.madrid.org) (J.C. Angulo).

**KEYWORDS**

Bladder neoplasia;  
Molecular staging;  
RT-PCR;  
MMP-2;  
MMP-9;  
TIMP-2

**Detection and Molecular Staging of Bladder Cancer Using Real-Time RT-PCR for Gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-2 in Peripheral Blood****Abstract**

**Introduction:** Molecular staging of bladder cancer based on the detection of mRNA of urothelial specific genes in circulating cancer cells has been inconclusive. We analyze whether real-time RT-PCR evaluation of gelatinases (MMP-9, MMP-2) and TIMP-2 in peripheral blood to diagnose and characterize patients with bladder neoplasm.

**Material and method:** Total RNA is extracted from circulating blood cells in 42 individuals (11 healthy controls, 31 patients with bladder cancer of different stages) and real-time RT-PCR performed using specific primers for MMP-9, MMP-2, TIMP-2 and ribosomal 18S. The quantification values of mRNA are described as relative to 18S mRNA ( $\Delta\Delta Ct$  method) and the results are blindly compared with data obtained from histological diagnosis and clinical staging.

**Results:** Normalized levels of MMP-9 and MMP-2 mRNA are higher in patients with cancer than controls ( $1.82 \pm 0.6$ -fold and  $2.7 \pm 0.6$ -fold, respectively;  $P < .05$ ). Patients with metastatic disease also have increased MMP-9, MMP-2 and TIMP-2 mRNA levels ( $9.6 \pm 0.20$ -fold,  $5.22 \pm 0.26$ -fold and  $1.97 \pm 0.22$ -fold, respectively;  $P < .05$ ). MMP-9 and MMP-2 are also associated with advanced clinical stage and grade ( $P < .05$ ). A ratio between variables that increases the ability to segregate patients with Ta, T1, T2-4M0 and T2-4M1 tumours is proposed.

**Conclusions:** Both non-invasive bladder tumor recognition and molecular staging of the disease is possible using real-time RT-PCR-based detection of gelatinases and TIMP-2 in peripheral blood. The ability to distinguish metastatic disease is higher for MMP-9 but MMP-2 discriminates better levels of tumour invasion. Further investigation in this field could yield promising results regarding molecular evaluation of bladder neoplasia.

© 2010 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

El fracaso terapéutico de metástasis distante en neoplasia vesical apenas ha cambiado en décadas, debido a que la diseminación de enfermedad oculta se presenta a menudo en el momento del tratamiento primario, y muchos tumores invasivos de alto grado desarrollan metástasis tempranas durante el seguimiento. Por supuesto, los mejores pronosticadores de control del cáncer y supervivencia en el cáncer vesical son la magnitud de la enfermedad y el grado histológico<sup>1</sup>, sin embargo muchos marcadores moleculares están siendo investigados en profundidad en el tejido neoplásico, la orina o la sangre para una supuesta correlación con la mayor probabilidad de diseminación distante.

Un aspecto importante de la cascada metastásica es el proceso de degradación de la matriz extracelular (MEC) por enzimas proteolíticas específicas. Las células tumorales tienen la capacidad de juntar sus mecanismos proteolíticos con la motilidad de una manera altamente organizada para conseguir invasión en lugares inapropiados. Un papel fundamental en este proceso de degradación se atribuye a las metaloproteasas de matriz (MMP), una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que regulan la integridad y composición de la MEC. La actividad de MMP-2 y MMP-9 (gelatinasas) se regula a varios niveles, incluyendo la transcripción, secreción, activación e inhibición por inhibidores de tejido de metaloproteinasas (TIMP). La sobreproducción de MMP por tumores que interactúan con los sistemas vascular y linfático podría dar lugar a niveles más altos de MMP y TIMP, no sólo en los tejidos sino también en otros fluidos biológicos, tales como la sangre o la orina. Muchos estudios han subrayado la sobreexpresión de MMP y TIMP

en la neoplasia vesical (tabla 1)<sup>2-24</sup>. Hemos investigado un nuevo abordaje para evaluar la actividad de MMP empleando RT-PCR a tiempo real en células mononucleares de sangre periférica, con énfasis especial sobre la amplificación génica de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 en controles sanos y pacientes con neoplasia vesical.

**Materiales y métodos****Población de estudio**

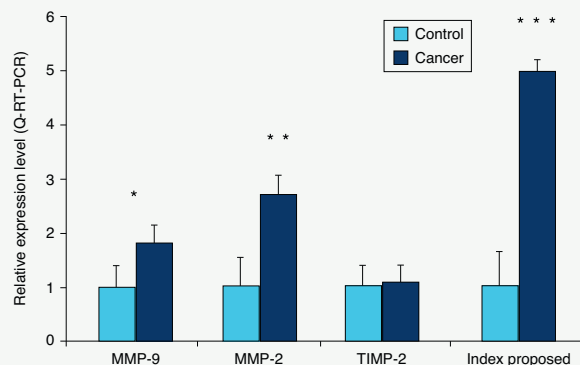
El estudio se llevó a cabo con 42 sujetos (36 varones, 6 mujeres), con edad media de 64 años (IC 95%: 59,7-68,3; rango: 29-90), que incluye controles de edad y género emparejados por individuos sanos ( $n = 11$ ) y pacientes con neoplasia vesical ( $n = 31$ ) diagnosticados y tratados en nuestro centro. Todos los pacientes recibieron resección transuretral primaria de la neoplasia vesical y 8 también cistectomía. Un estudio preoperatorio reveló diseminación metastásica en 5 casos (16%) y un estudio histopatológico definió 2 tumores de grado 1, 6 de grado 2 y 23 de grado 3 (criterios de la OMS). Los estadios tumorales son Ta ( $n = 7$ ), T<sub>1</sub> ( $n = 8$ ), T<sub>2</sub> ( $n = 7$ ), T<sub>3</sub> ( $n = 4$ ) y T<sub>4</sub> ( $n = 5$ ), según los criterios de la AJCC 2006. Todos los pacientes dieron su consentimiento para donar material biológico, de acuerdo con los requisitos del Comité Ético de Investigación Clínica del centro.

**Muestras y aislamiento del ARN**

Se toman muestras de sangre periférica de pacientes intraoperatoriamente en el momento de la inducción anes-

**Tabla 1** Evolución de la evaluación de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 para caracterizar neoplasia vesical.

Autor (ref.)	Número pacientes	Fuente muestra	Método de detección	Conclusiones propuestas
Margulies et al (2)	55	Orina/sobrenadante	ELISA, Western blot, Zimografía	Niveles MMP-2 aumentaron en cáncer sobre control
Davies et al (3)	49	Tejido/homogeneizado	Zimografía	MMP-9 y MMP-2 correlacionado con estadio y grado
Gohji et al (4)	233	Suero	ELISA	MMP-2 elevado en enfermedad avanzada
Grignon et al (5)	42	Tejido/congelado	Inmunohistoquímica	TIMP-2 en células tumorales o estroma peor supervivencia
Moses et al (6)	10	Orina/sobrenadante	Zimografía	MMP-9 y MMP-2 detectada en pacientes con cáncer
Bianco et al (7)	65	Lavado vesical	Zimografía	MMP-9 correlaciona con estadio y grado
Gohji et al (8)	224	Suero	ELISA	Alta relación MMP-2/TIMP-2 baja supervivencia
Kanayama et al (9)	41	Tejido/congelado	RT-PCR	MMP-2 & TIMP-2 correlacionado con estadio
Hamasaki et al (10)		Línea celular T24	RT-PCR, EIA	Desequilibrio MMP-2/TIMP-2 implica progresión
Furukawa et al (11)		Líneas UCT1 y 2	RT-PCR	MMP-2 más alto en implantes línea UCT-1 invasivos
Ozdemir et al (12)	33	Orina/sobrenadante	ELISA	MMP-9 detectable en cáncer pero no en controles
Ozdemir et al (12)	60	Tejido/parafina	Inmunohistoquímica	MMP-9 correlacionada con lisis de membrana basal
Kanda et al (13)	61	Tejido/congelado	Zimografía	MMP-2 correlaciona con grado, estadio y resultado
Monier et al (14)	101	Orina	ELISA, inmunotransferencia	Desequilibrio entre MMP-2,-9 y TIMP-2
Guan et al (15)	52	Suero	ELISA	MMP-9 correlaciona con grado y estadio
Eissa et al (16)	110	Orina/lavado vejiga	ELISA	MMP-9 aumenta sensibilidad de citología de orina
Gakiopoulou et al (17)	106	Tejido/parafina	Inmunohistoquímica	TIMP-2 asociado a grado, estadio y resultado
Durkan et al (18)	118	Orina y tejido/parafina	ELISA	MMP-9 correlaciona con estadio y tamaño
Vasala et al (19)	54	Tejido/parafina	Inmunohistoquímica	MMP-2 correlaciona con estadio y peor supervivencia
Sumi et al (20)	20	Tejidos/parafina	Inmunohistoquímica	MMP-2 correlaciona con grado y estadio
Chaffer et al (21)		Líneas TSU-Pr1	RT-PCR	MMP-9 & TIMP-2 aumento en líneas metastáticas
Vasala et al (22)	94	Suero	ELISA	Alto proMMP-2 y TIMP-2 mejor pronóstico
Vasala et al (23)	84	Suero	ELISA	Bajo TIMP-2 y MMP-2:TIMP-2 peor pronóstico
Fernández et al (24)	530	Orina	ELISA y zimografía	MMP-9 usado para controlar pacientes
Angulo et al (presente)	42	Células mononucleares de sangre periférica	RT-PCR a tiempo real	MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 permite diagnóstico y estadificación molecular



**Figura 1** Comparación entre expresión MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 por RT-PCR cuantitativa en células de sangre periférica de pacientes con o sin cáncer vesical. El índice propuesto fue definido como  $[(MMP-9 + MMP-2) - TIMP-2] / (MMP-9 + MMP-2)$ . El ARN total se empleó para síntesis de primera cadena de ADNc. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias) contra control (sin cáncer). Las medias  $\pm$  DE para los 4 grupos fueron comparadas empleando la prueba U Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

tésica y en la extracción rápida matinal en el caso de los controles (9-12 ml), recogida en tubos que contienen EDTA, transportada al laboratorio y procesada en menos de 2 horas. Se aísla la fracción de célula mononuclear como una capa intermedia por centrifugación en gradiente de densidad en presencia de Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) durante 20 minutos a 2.100 rpm a 4°C. El ARN total se prepara de células muestra usando Rneasy (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), según las instrucciones propuestas por el fabricante. La producción de ARN se determina espectrofotométricamente a 260 y 280 nm y las relaciones de densidad ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) son medidas para asegurar la calidad de ARN aislado empleando el espectrofotómetro ND-100 (Nanodrop Technology). La relación media ha sido de 1,8 a 2,1 para todas las muestras. Para TI, una alícuota con 1-2  $\mu$ g de ARN total de cada muestra se usa para la primera cadena de ADNc en un volumen total de 20-40  $\mu$ l usando 0,75  $\mu$ l (0,5 mg) de cebadores aleatorios (Promega, Madison, WI) y 0,5  $\mu$ l (12,5 mmol/l) mezcla dNTPs (Ecogen, España), incubado a 70°C durante 10 minutos y enfriado inmediatamente sobre hielo para evitar la renaturalización. La siguiente mezcla TI se prepara en 10-20  $\mu$ l para cada muestra: 4-8  $\mu$ l buffer TI VLMM (5x) (Sigma), 0,5  $\mu$ l (20 U) del inhibidor del RNase (RNasin, Promega) y 1  $\mu$ l (100 U) del virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM) transcriptasa inversa e incubado a 25°C durante 5 minutos y 37°C durante 50 minutos, la reacción se para a 95°C durante 5 minutos para inactivar la TI.

#### RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Se llevó a cabo análisis PCR empleando el iCycler Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Se emplearon ensayos de expresión génica (TaqMan Assay, Applied Biosystems): MMP2, Hs00234422.m1; MMP9, Hs00234579.m1; TIMP2, Hs00234278.m1; y 18S,

Hs99999901.s1. Cien ng de plantilla ADNc se añaden a 10  $\mu$ l TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 1  $\mu$ l TaqMan Assay específico para los genes indicados, para un volumen final de 20  $\mu$ l. Las reacciones PCR se incuban durante 10 minutos a 95°C, después de lo cual se lleva a cabo la amplificación del objetivo con 45 ciclos de dos fases, con 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C. Cada muestra se analiza por triplicado para verificar los resultados. Los niveles de transcripción, normalizados a aquellos de 18S (usados como estándar interno) para dar cuenta de la variabilidad en la cantidad de ADNc en cada muestra y niveles de expresión relativa, son calculados aplicando el método  $\Delta\Delta C_T$ . El nivel de expresión relativa del gen objetivo se da por  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , donde  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ target gene}} - \Delta C_{T18S}$ . El cálculo comparativo  $C_T$  es válido cuando la eficacia de la amplificación objetivo tiende a igualar la amplificación de referencia. Todos los ensayos de expresión génica TaqMan tienen eficiencias de amplificación muy cercanas a 1.

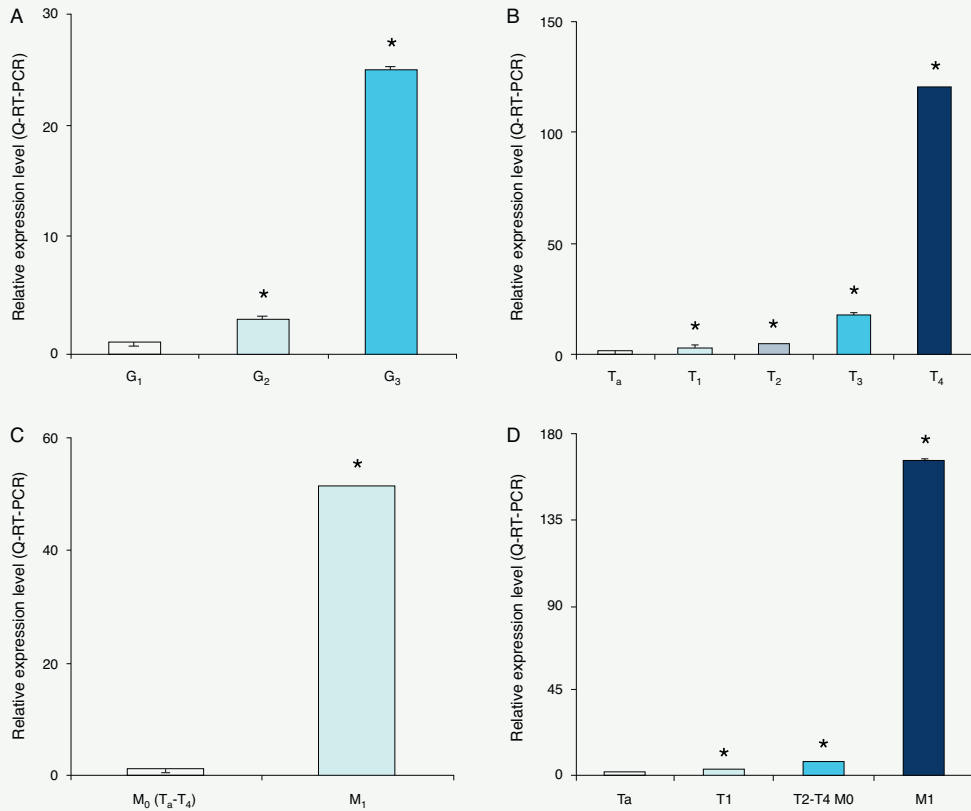
#### Método estadístico

La comparación de las escalas ponderadas entre grupos se realizó con la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Los análisis se realizaron empleando SPSS 13.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL) y se consideró la significación estadística a nivel 0,05.

#### Resultados

##### Expresión de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 ARNm en sangre periférica

La muestra analizada en este estudio muestra los niveles en estado constante de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2. En sangre periférica de pacientes con neoplasia vesical los niveles normalizados de ARNm de MMP-9 y MMP-2 son respectiva-

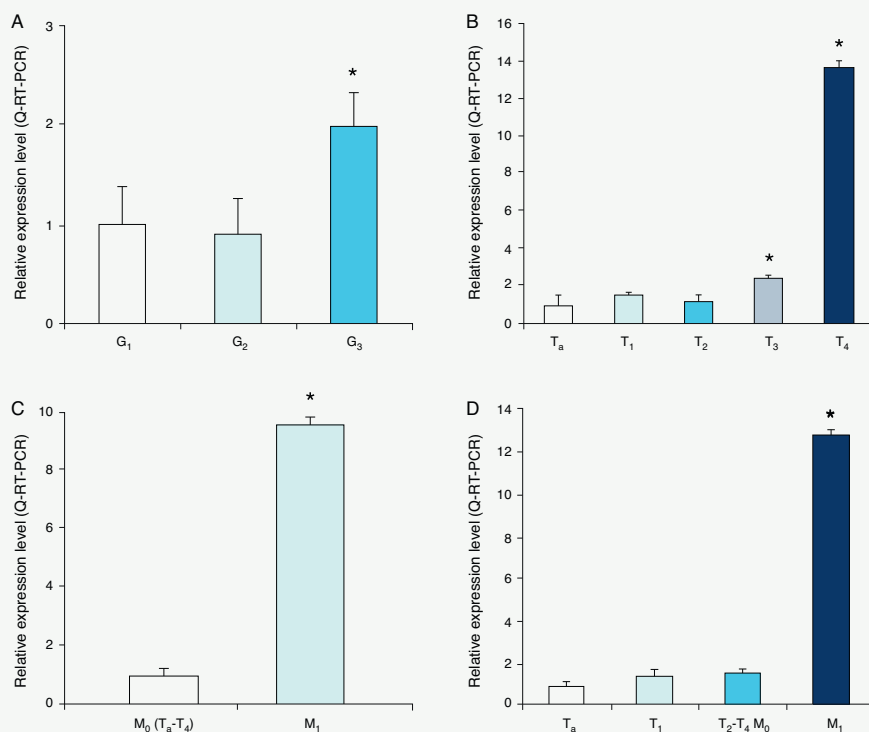


**Figura 2** A. Expresión de MMP-9 ARNm en células de sangre periférica de pacientes con cáncer vesical de diferente grado histológico. B. Clasificación clínica. C. Estado metastático. D. estadio tumoral. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias) contra muestra de referencia (\* $p < 0,05$ ).

mente  $1,82 \pm 0,6$  y  $2,7 \pm 0,6$  veces más altos en pacientes con cáncer que controles ( $p < 0,05$ ); sin embargo, los niveles normalizados de TIMP-2 no muestran las diferencias entre controles y pacientes con neoplasia (fig. 1).

En relación con la población de pacientes con carcinoma de células transicionales de la vejiga confirmado histológicamente, tanto los niveles ARNm de MMP-9 y MMP-2 se correlacionan con el grado histológico asignado. MMP-9 es significativamente más alto en tumores de grado 3 ( $1,97 \pm 0,34$  veces) en comparación con grado 1, sin embargo no existe diferencia entre el nivel ARNm de grado 2 ( $0,89 \pm 0,37$  veces) y grado 1 (fig. 2). El nivel MMP-2 es más alto tanto en tumores de grado 3 ( $8,31 \pm 0,38$  veces) y grado 2 ( $8,80 \pm 0,33$  veces) respecto al grado 1 (fig. 3). Niveles normalizados de TIMP-2 no muestran las diferencias relativas en cuanto a las diferentes clasificaciones de grados, aunque se mostró una tendencia a expresión disminuida en tumores G3 en comparación a G1 y/o G2 ( $p = 0,09$ ) (fig. 4).

En relación con el estadio clínico, tanto el grado de invasión mural en la vejiga (T) como la presencia de metástasis visceral (M) han sido analizados y correlacionados con niveles ARNm de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2. En cuanto a la clasificación T, el nivel de MMP-9 es significativamente más alto en pacientes con tumores T<sub>4</sub> ( $13,6 \pm 0,36$  veces) y T<sub>3</sub> ( $2,3 \pm 0,3$  veces), sin embargo no en T<sub>2</sub> ( $1,15 \pm 0,38$  veces) ni en T<sub>1</sub> ( $1,43 \pm 0,27$  veces) al compararlo con lesiones T<sub>a</sub> no invasivas (fig. 2). La expresión de MMP-2 se correlaciona mejor con la profundidad de invasión, ya que el nivel de MMP-2 fue significativamente más alto en T<sub>4</sub> ( $8,44 \pm 0,38$  veces), T<sub>3</sub> ( $7,7 \pm 0,32$  veces), T<sub>2</sub> ( $4,45 \pm 0,4$ ) y T<sub>1</sub> ( $2,21 \pm 0,34$ ) respecto a T<sub>a</sub> (fig. 3). Niveles normalizados de TIMP-2 no muestran diferencias relativas entre clasificaciones (fig. 4). En cuanto a la clasificación M, un incremento estadísticamente significativo se observa en la expresión de MMP-9 ( $9,6 \pm 0,2$  veces), MMP-2 ( $5,22 \pm 0,27$  veces) y TIMP-2 ( $1,97 \pm 0,22$  veces) al comparar enfermedad



**Figura 3** A. Expresión de MMP-2 ARNm en células de sangre periférica de pacientes con cáncer vesical de diferente grado histológico. B. Clasificación clínica T. C. Estado metastático. D. Estado tumoral. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias) contra muestra de referencia (\* $p < 0,05$ ).

metastásica ( $M_1$ ) con enfermedad no metastásica ( $M_0$ ) (figs. 2–4).

Por razones prácticas se pueden definir 4 niveles diferentes desde una perspectiva clínica:

1.  $T_a$  (no invasivo).
2.  $T_1$  invasivo de la lámina propia (microinvasivo);
3.  $T_{2-4}M_0$  invasivo del músculo o más allá (profundamente invasivo) no metastático.
4.  $T_{2-4}M_1$  (metastático).

La capacidad que tienen los niveles de ARNm de distinguir entre estos 4 niveles diferentes de invasión tumoral también se ha investigado. MMP-9 es significativamente más alto en  $T_{2-4}M_1$  ( $12,72 \pm 0,2$  veces), pero no en pacientes  $T_{2-4}M_0$  ( $1,5 \pm 0,21$ -veces) y  $T_1$  ( $1,43 \pm 0,27$  veces) al compararlo con  $T_a$  no invasivo (fig. 2). MMP-2 es significativamente más alto en  $T_{2-4}M_1$  ( $12,62 \pm 0,25$  veces),  $T_{2-4}M_0$  ( $4,44 \pm 0,26$  veces) y  $T_1$  ( $2,21 \pm 0,34$  veces) respecto a  $T_a$  (fig. 3). El nivel TIMP-2 es significativamente más alto en  $T_{2-4}M_1$  ( $1,8 \pm 0,22$  veces) en comparación con la enfermedad  $T_{2-4}M_0$ . No obstante, no

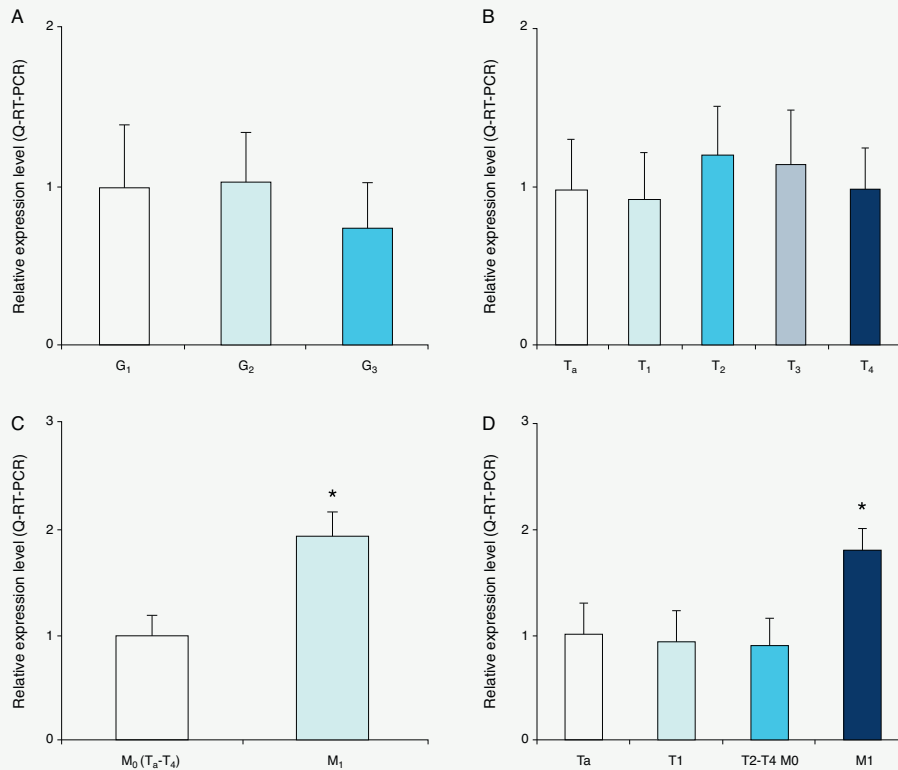
se observa diferencia entre niveles TIMP-2 de enfermedad  $T_{2-4}M_0$ ,  $T_1$  o  $T_a$  (fig. 4).

#### Propuesta de índice para aumentar la capacidad de estadificación molecular

Se puede proponer un índice basado en el efecto aditivo de gelatinasas MMP-9 y MMP-2 y el efecto inhibitorio de TIMP-2, que contrarresta la actividad de MMP-2:  $(MMP-9 + MMP-2) \cdot TIMP-2 / (MMP-9 + MMP-2)$ . Por supuesto, cada expresión génica individual debe ser corregida en relación con la expresión del gen de mantenimiento, 18S. Empleando esta relación la expresión génica combinada relativa es significativamente más alta en neoplasia que en controles ( $4,95 \pm 0,21$  veces;  $p < 0,05$ ).

Además, la cuantificación relativa usando el método CT comparativo para este índice aumenta la capacidad de segregar pacientes con tumores de diferentes grados y que afectan a todos los niveles de invasión mural, y también para distinguir enfermedad metastásica. El índice también se correlaciona con el grado tumoral, ya que es más alto





**Figura 4** A. Expresión de TIMP-2 ARNm en células de sangre periférica de pacientes con cáncer vesical de diferente grado histológico. B. Clasificación clínica T. C. Estado metastático. D. estadio tumoral. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias) contra muestra de referencia (\* $p < 0,05$ ).

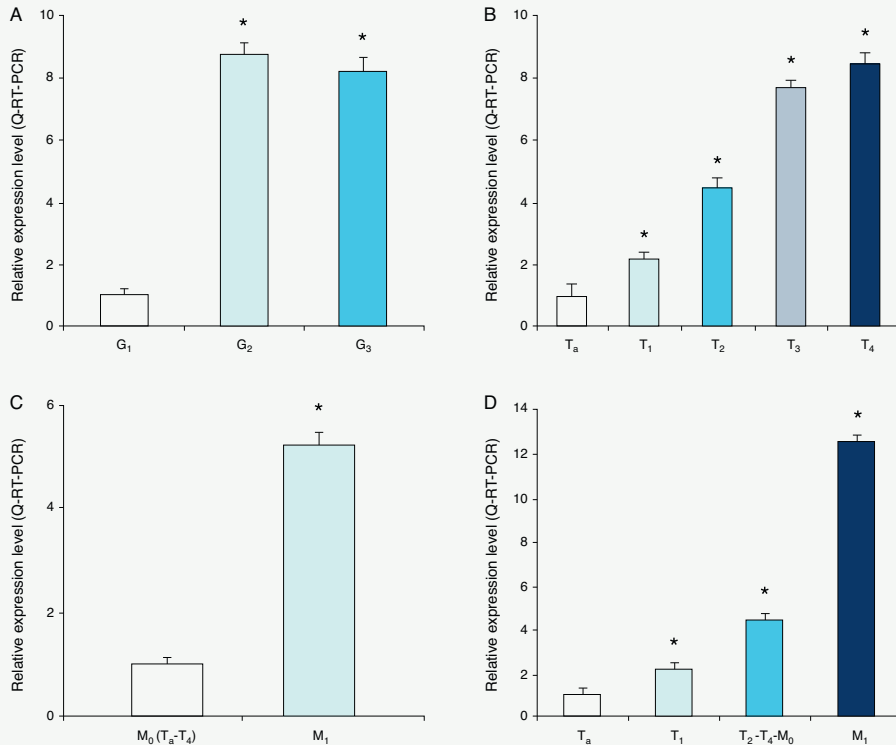
tanto en tumores de grado 3 ( $25,2 \pm 0,26$ -veces) como de grado 2 ( $2,98 \pm 0,18$ -veces) respecto a grado 1 (fig. 5). La profundidad de la invasión es significativamente más alta en T<sub>4</sub> ( $120,1 \pm 0,36$ -veces), T<sub>3</sub> ( $18,12 \pm 0,1$ -veces), T<sub>2</sub> ( $5,14 \pm 0,36$ -veces) y T<sub>1</sub> ( $3,1 \pm 0,07$ -veces) respecto a Ta (fig. 5), y la diferencia es aún mayor en cuanto a la presencia de enfermedad metastásica ( $51,7 \pm 0,24$  -veces) frente a enfermedad no metastásica (M<sub>0</sub>) (fig. 5). En definitiva, el índice es significativamente más alto en T<sub>2-4</sub> M<sub>1</sub> ( $166 \pm 0,15$ -veces), T<sub>2-4</sub> M<sub>0</sub> ( $6,76 \pm 0,36$ -veces) y T<sub>1</sub> ( $3,06 \pm 0,08$ -veces) respecto a T<sub>a</sub> (fig. 5).

## Discusión

Varios autores han estudiado el papel de MMP y más específicamente de gelatinasas y TIMP-2 en la neoplasia vesical<sup>2-24</sup>. Se han aplicado abordajes diferentes para estudiar la actividad de estas enzimas de degradación de MEC. A menudo se

han buscado en tejidos cancerosos de la vejiga, otras veces en muestras de barbotage de orina, y más recientemente en el suero de pacientes. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la expresión de metaloproteínasa ARNm en sangre periférica de pacientes con y sin carcinoma de células transicionales de la vejiga.

Marguiles et al fueron pioneros al sugerir que la neoplasia vesical se correlaciona con un aumento en la actividad colagenasa<sup>2</sup>. Después, Davies et al reportaron la expresión pro-MMP-9 y pro-MMP-2 significativamente relacionada con el grado de tumor vesical utilizando zimografía en gelatina cuantitativa e hibridización *in situ*<sup>3</sup>. También detectaron que los niveles de MMP-9 eran significativamente más altos en el cáncer vesical que en los controles. Colaboramos para realizar el primer análisis inmunohistoquímico de gelatinasas en el cáncer vesical y observamos inmunotinción en aproximadamente 3 de 4 neoplasias vesicales invasivas<sup>5</sup>. Estaban localizadas predominantemente, pero no exclusivamente, en células cancerosas. De hecho, la tinción difusa



**Figura 5** A. Cuantificación relativa usando el índice  $[(MMP-9 + MMP-2) - TIMP-2] / (MMP-9 + MMP-2)$  ARNm en células de sangre periférica de pacientes con cáncer vesical de diferente grado histológico. B. Clasificación clínica T. C. Estado metastático. D. Estadío tumoral. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias) contra muestra de referencia (\* $p < 0,05$ ).

débil se mostró dentro del estroma. No pudimos identificar una correlación entre expresión y estadio MMP-2 o MMP-9. Sin embargo, las lesiones eran uniformemente carcinomas músculo-invasivos de alto grado. Además, la expresión de gelatinasa no se pudo correlacionar con la supervivencia. Se detectó TIMP-2 tanto en células neoplásicas como en el estroma, y asociado a la ausencia de inmunotinción de colágeno del tipo IV y con bastante peor supervivencia<sup>5</sup>. El alto nivel de TIMP-2 estromal relacionó con baja supervivencia y fue asociado a la pérdida extensiva de membrana basal. Muchos otros trabajos han evaluado las implicaciones pronósticas de la determinación inmunohistoquímica de componentes MEC en la neoplasia vesical, y básicamente han confirmado los hallazgos de Grignon et al<sup>12,17-20</sup>. La expresión incrementada de MMP-2 y TIMP-2 puede determinar el pronóstico<sup>3-5,9,13,17,19,20</sup>. De hecho, un estudio que analiza 1.176 genes relacionados con el cáncer por RT-PCR en tejidos vesicales cancerosos ha demostrado que MMP-2 y TIMP-2 se expresaron en el 100% de los pacientes que fallecieron como consecuencia de la enfermedad<sup>25</sup>. Investigaciones

sobre otros MMP como matrilisina (MMP-7) también parecen prometedoras para pronosticar el resultado de pacientes con cáncer de vejiga<sup>26</sup>, aunque no se puede decir lo mismo para colagenasa 3 (MMP-13)<sup>27</sup>.

Bianco et al midieron la expresión de gelatinasas en células vesicales exfoliadas y descubrieron una correlación significativa entre expresión de pro-MMP-9 y presencia de neoplasia<sup>7</sup>. Otros autores han investigado MMP-2 y MMP-9 como marcadores de neoplasia vesical, bien empleando zimografía en gelatina, técnicas de inmunotransferencia o ELISA en orina<sup>2,6,12,18</sup>. También se han llevado a cabo estudios serológicos de MMP. Nauro et al descubrieron que pacientes con tumores avanzados o metastásicos tenían casi el doble del nivel TIMP-1 en comparación con controles<sup>28</sup>. Gohji et al no hallaron ninguna diferencia en niveles circulantes de MMP-2 entre neoplasia superficial y controles<sup>4</sup>. Más tarde este grupo refirió un riesgo más alto de recurrencia y progresión cuando la relación MMP-2/TIMP-2 era elevada<sup>8</sup>.

No hay duda de que existe un proceso regulatorio entre metaloproteinasas e inhibidores de tejido en la progresión

tumoral y desarrollo de metástasis. Numerosos informes evidencian que la expresión génica de MMP y la activación están relacionadas con el potencial de invasión de células cancerosas. Inicialmente se consideraba que las MMP eran producidas exclusivamente por células tumorales. Este concepto muy pronto fue sustituido por la más extendida creencia de que algunas MMP son producidas principalmente por el estroma, por ejemplo, estromelisin (MMP-3) producida por fibroblastos tumorales. De manera similar, TIMP-1 y TIMP-2 parecen ser producidos como respuesta en el receptor, contrarrestando la actividad de colagenasa y gelatinasa, y han sido detectados tanto en células neoplásicas como estromales. La expresión de TIMP-2 parece tener funciones contradictorias, como factor de crecimiento. Por una parte, puede facilitar el desarrollo de la metástasis, pero por otro lado puede inhibir la angiogénesis como respuesta homeostática a alta expresión MMP-2, limitando por tanto el desarrollo de la metástasis. Hoy día es cada vez más evidente que tanto MMP-2 como TIMP-2 son producidos no solamente en las células intratumorales estromales, sino también en las células peritumorales estromales y en tejidos no neoplásicos. De hecho, la función de MMPs en condiciones no neoplásicas con mayor angiogénesis como la gestación, curación de lesiones o enfermedades inflamatorias ha sido bien documentada<sup>29</sup>.

Por supuesto, las discrepancias entre los niveles MMP-2 ARNm en estado constante y actividad enzimática se pueden explicar por diferente regulación a nivel postranscripcional. La expresión de ambas gelatinasas ARNm que confirmamos en sangre periférica de controles sanos sugiere producción no neoplásica. Varios tipos de células podrían actuar como fuentes para la producción de MMP, no sólo linfocitos, y posiblemente linfocitos asociados a tumores, pero también monocitos circulantes y macrófagos tisulares. La reacción local inflamatoria que se suele asociar a neoplasia avanzada también podría estimular la sobreexpresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 ARNm. Existen dudas de que la presencia de micrometástasis o células tumorales circulantes podría contribuir al aumento de expresión de gelatinasa en casos avanzados; sin embargo, esta circunstancia no se puede esperar en controles sanos o en neoplasia vesical intraepitelial no invasiva.

La expresión de RT-PCR ARNm en sangre periférica de MMP se debe investigar en ambiente clínico. Nuestros resultados sugieren que se puede emplear como marcador de la actividad de remodelación de MEC asociado a la presencia de neoplasia vesical, y también se puede correlacionar con grado tumoral, profundidad de la invasión y presencia de metástasis. El aumento de actividad de la gelatinasa podría contribuir a la agresividad tumoral, no necesariamente a través de la invasividad tumoral directa, sino por otros efectos como la neoangiogénesis<sup>30</sup>. Las implicaciones pronósticas de esta técnica para la estadificación molecular en cáncer vesical parecen ser muy prometedoras.

## Financiación

Este trabajo ha sido financiado exclusivamente mediante una Beca de la Fundación para la Investigación en Urología del año 2007.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Carlos Pascual Mateo por el trabajo realizado.

## Bibliografía

- Angulo JC, López JI, Flores N, Toledo JD. The value of tumor spread, grading and growth pattern as morphologic predictive parameters in bladder carcinoma. A revision of 1987 TNM Classification J Cancer Res Clin Oncol. 1993;119:578-93.
- Margulies IM, Hoyhtya M, Evans C, Stracke ML, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Urinary type IV collagenase: elevated levels are associated with bladder transitional cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1992;1:467-74.
- Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, et al. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. Cancer Res. 1993;53:5365-9.
- Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, Komiyama T, Okawa J, Nakajima M. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. Cancer Res. 1996;56:3196-8.
- Grignon DJ, Sakr W, Toth M, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. Cancer Res. 1996;56:1654-9.
- Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. Cancer Res. 1998;58:1395-9.
- Bianco Jr FJ, Gervasi DC, Tiguer R, Grignon DJ, Pontes JE, Crissman JD, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. Clin Cancer Res. 1998;4:3011-6.
- Gohji K, Fujimoto N, Ohkawa J, Fujii A, Nakajima M. Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. Br J Cancer. 1998;77:650-5.
- Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, Murakami Y, Nishitani M, Kagawa S. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. Cancer. 1998;82:1359-66.
- Hamasaki T, Hattori T, Kimura G, Nakazawa N. Tumor progression and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) mRNA by human urinary bladder cancer cells. Urol Res. 1998;26:371-6.
- Furukawa A, Tsuji M, Nishitani M, Kanda K, Inoue Y, Kanayama H, et al. Role of the matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase families in non-invasive and invasive tumors transplanted in mice with severe combined immunodeficiency. Urology. 1998;51:849-53.
- Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Yoshida O. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. J Urol. 1999;161:1359-63.
- Kanda K, Takahashi M, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S. The role of the activated form of matrix-metalloproteinase-2 in urothelial cancer. Br J Urol Int. 2000;86:553-7.
- Monier F, Mollier S, Guillot M, Rambeaud JJ, Morel F, Zaoui P. Urinary release of 72 and 92 kDa Gelatinases, TIMP-2. N-GAL

- and conventional prognostic factors in urothelial carcinomas *Eur Urol.* 2002;42:356–63.
15. Guan K, Ye H, Yan Z, Wang Y, Hou S. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 2003;61:719–23.
  16. Eissa S, Labib RA, Mourad S, Kamel K, El-Ahmady O. Comparison of telomerase activity and matrix metalloproteinase-9 in voided urine and bladder wash samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Eur Urol.* 2003;44:687–94.
  17. Gakiopoulou H, Nakopoulou L, Siatelis A, Mavrommatis I, Panayotopoulou EG, Tsimpa I, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clinical Cancer Res.* 2003;9:5573–81.
  18. Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, Rajjayabun PH, Robinson MC, Neal DE, et al. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9:2576–82.
  19. Vasala K, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. *Urology.* 2003;62:952–7.
  20. Sumi T, Yoshida H, Hyun Y, Yasui T, Matsumoto Y, Hattori K, et al. Expression of matrix metalloproteinases in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncology Reports.* 2003;10:345–9.
  21. Chaffer CL, Dopheide B, McCulloch DR, Lee AB, Moseley JM, Thompson EW, et al. Upregulated MT1-MMP/TIMP-2 axis in the TSU-Pr1-B1/B2 model of metastatic progression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Exper Metastases.* 2005;22:115–25.
  22. Vasala K, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and matrix metalloproteinase-2 in complex with the inhibitor (MMP-2:TIMP-2) as prognostic markers in bladder cancer. *Clin Biochem.* 2007;40:640–4.
  23. Vasala K, Kuvaja P, Turpeenniemi-Hujanen T. Low circulating levels of proMMP-2 are associated with adverse prognosis in bladder cancer. *Tumour Biol.* 2008;29:279–86.
  24. Fernández CA, Wszolek MF, Loughlin KR, Libertino JA, Summerhayes IC, Shuber AP. A novel approach to using matrix metalloproteinases for bladder cancer. *J Urol.* 2009;182:2188–94.
  25. Grimm MO, Modlich O, Brosius U, Struse K, Bojar H, Vogeli TA. Expression and progression pattern of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 2000;4:557.
  26. Szarvas T, Becker M, Dorp FV, Gethmann C, Tötsch M, Bánkfalvi A, Schmid KW, et al. Matrix metalloproteinase-7 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in bladder cancer. *Cancer Sci.* 2010;101:1300–8.
  27. Rodríguez Faba O, Fernández Gómez JM, Palou Redorta J, Escaf Barmadah S, Vizoso F, Villavicencia Mavrich H. Significance of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) in invasive bladder cancer: correlation with pathological parameters. *Urol Int.* 2007;78:140–4.
  28. Naruo S, Kanayama H, Takigawa H, Kagawa S, Yamashita K, Hayakawa T. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *Int J Urol.* 1994;1:228–31.
  29. Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:121–31.
  30. Masson V, de la Ballina LR, Munaut C, Wielockx B, Jost M, Mailard C, et al. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.* 2005;19:234–6.

**ANEXO II. Publicación Actas Urol Esp 2013; 37:480-8.**





ARTÍCULO ORIGINAL

## El papel de la metaloproteínasa de la matriz MMP-9 y del inhibidor tisular de metaloproteínasa TIMP-2 como marcadores séricos de cáncer vesical

F. Ramón de Fata<sup>a,\*</sup>, A. Ferruelo<sup>b</sup>, G. Andrés<sup>a</sup>, H. Gimbernat<sup>a</sup>,  
M. Sánchez-Chapado<sup>c</sup> y J.C. Angulo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Urología, Hospital Universitario de Getafe, Fundación para la Investigación Biomédica, Universidad Europea de Madrid, Madrid, España

<sup>b</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Getafe, Fundación para la Investigación Biomédica, Madrid, España

<sup>c</sup> Servicio de Urología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España

Recibido el 29 de mayo de 2013; aceptado el 29 de mayo de 2013

Disponible en Internet el 31 de julio de 2013

### PALABRAS CLAVE

Metaloproteínasa-2;  
Metaloproteínasa-9;  
Inhibidor Tisular de  
Metaloproteínasa-2;  
Ensayo por  
inmunoabsorción  
ligado a enzimas

### Resumen

**Introducción:** El diagnóstico y la estadificación molecular del cáncer vesical basados en la detección de ARNm de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en células circulantes y mononucleares de sangre periférica han mostrado resultados prometedores. Analizamos si la determinación de los correspondientes productos de síntesis proteica permite diagnosticar y caracterizar pacientes con neoplasia vesical.

**Material y método:** Se ha llevado a cabo la cuantificación de los niveles séricos de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 en una serie de 42 individuos (31 pacientes con cáncer vesical en diversos estadios y 11 controles sanos) mediante técnica de ELISA. Se compararon las determinaciones entre casos y controles (U Mann-Whitney), así como entre diferentes grupos de tumores (U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis), según las características clínico-patológicas (edad, sexo, categoría T, categoría M o grado). Se evaluó el rendimiento diagnóstico de estos marcadores mediante análisis de curvas ROC.

**Resultados:** Existe correlación entre las determinaciones de MMP-2 y TIMP-2 ( $R=0,699$ ;  $p>0,0001$ ) y de MMP-9 y TIMP-2 ( $R=0,305$ ;  $p=0,049$ ). Los pacientes con cáncer de vejiga presentan niveles más elevados de MMP-9 ( $p<0,0001$ ) y TIMP-2 ( $p=0,047$ ) que los controles. Así mismo, el cociente MMP-9/TIMP-2 también es superior en pacientes con cáncer ( $p<0,001$ ). No se detectan diferencias entre cáncer y control respecto a edad ( $p=0,64$ ) o sexo ( $p=0,64$ ). Tampoco se detectan diferencias con respecto a MMP-2 ( $p=0,35$ ) ni al cociente MMP-2/TIMP-2 ( $p=0,45$ ). Dentro de la población de pacientes con cáncer los valores de MMP-2 y MMP-9 difieren

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: frfata@hotmail.com (F. Ramón de Fata).

**KEYWORDS**

Metalloproteinase-2;  
Metalloproteinase-9;  
Tisular Inhibitor of  
Metalloproteinase-2;  
Enzyme-Linked  
ImmunoSorbent Assay

según categoría T ( $p=0,022$  y  $p=0,038$ , respectivamente) y los de TIMP-2 según categoría M ( $p=0,036$ ). El análisis de curvas ROC mostró que tanto MMP-9 como el cociente MMP-9/TIMP-2 discriminan pacientes con cáncer y controles, con equivalente exactitud diagnóstica (ABC 0,953) y unos puntos de corte de 3,93 ng/ml (S 90%; E 81%) y de 0,053 ng/ml (S 96%; E 84%), respectivamente.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que tanto MMP-9 como TIMP-2 séricos podrían tener una aplicación en la predicción del desarrollo y progresión del cáncer vesical, y potencial utilidad como marcadores clínicos de la enfermedad. Se requieren estudios multicéntricos prospectivos que confirmen estos resultados preliminares.

© 2013 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### The role of matrix metalloproteinase MMP-9 and TIMP-2 tissue inhibitor of metalloproteinases as serum markers of bladder cancer

**Abstract**

**Introduction:** The diagnosis and molecular staging of bladder cancer based on the detection of gelatinases mRNA (MMP-2 and MMP-9) in peripheral blood circulating and mononuclear cells have shown promising results. We analyze if the determination of the corresponding protein synthesis products makes it possible to diagnose and characterize patients with bladder cancer.

**Material and method:** Quantification of the serum levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in a series of 42 individuals (31 patients with bladder cancer in different stages and 11 healthy controls) using the ELISA technique was carried out. The determinations were compared between cases and controls (Mann-Whitney U) and between different groups of tumors (Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis), according to the clinical-pathological characteristics (age, gender, T category, M category or grade). Diagnostic yield of these markers was evaluated by analysis of the ROC curves.

**Results:** There is a correlation between the determinations of MMP-2 and TIMP-2 ( $R=-.699$ ;  $P>.0001$ ) and MMP-9 and TIMP-2 ( $R=.305$ ;  $P=.049$ ). Patients with bladder cancer have higher levels of MMP-9 ( $p<0.0001$ ) and TIMP-2 ( $P=.047$ ) than the controls. Furthermore, the MMP-9/TIMP-2 ratio is also superior in cancer patients ( $P<.001$ ). Differences were not detected between cancer and controls regarding age ( $P=.64$ ) or gender ( $P=.64$ ). Differences were also not detected regarding MMP-2 ( $P=.35$ ) or MMP-2/TIMP-2 rate ( $P=.45$ ). Within the cancer patient population, the MMP-2 and MMP-9 values differ according to T category ( $P=.022$  and  $P=.038$ , respectively) and those of the TIMP-2 according to M category ( $P=.036$ ). ROC curve analysis showed that both MMP-9 and the MMP-9/TIMP-2 ratio discriminate patients with cancer and controls, with equivalent diagnostic accuracy (ABC 0.953) and cut offs of 3.93 ng/mL (S 90%; Sp 81%) and 0.053 ng/mL (S 96%; Sp 84%), respectively.

**Conclusions:** The results obtained suggest that both serum MMP-9 and TIMP-2 would have an application in the prediction of the development and progression of bladder cancer, and a potential utility as clinical markers of the disease. Multicenter, prospective studies that confirm their preliminary results are necessary.

© 2013 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

El fracaso terapéutico en el cáncer de vejiga generalmente se debe al desarrollo de metástasis oculta, presente a menudo en el momento del tratamiento primario<sup>1</sup>. Por supuesto, los mejores pronosticadores de control del cáncer y de supervivencia en los pacientes con cáncer vesical son la magnitud de la enfermedad y el grado histológico<sup>2</sup>. Ahora bien, muchos marcadores moleculares están siendo investigados en profundidad actualmente, bien en el tejido neoplásico, bien en la orina o en la sangre de los pacientes para establecer algún tipo de correlación con la mayor probabilidad de diseminación distante.

A pesar del elevado grado de desarrollo de diversas líneas de investigación centradas en epigenética, genómica y proteómica<sup>3,4</sup> debemos asumir que actualmente carecemos de marcadores moleculares de utilidad clínica para

el cáncer de vejiga. Un aspecto importante de la cascada metastásica es el proceso de degradación de la matriz extracelular (MEC) por enzimas proteolíticas específicas. Por ello la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMP), una familia de endopeptidasas dependientes de cinc que regulan la integridad y composición de la MEC, constituye uno de los mejores candidatos a ser considerados marcadores biológicos de cáncer vesical<sup>5</sup>. Conocemos su papel en la degradación del estroma del tejido conectivo y de la membrana basal, barreras naturales de la progresión tumoral<sup>6</sup>, pero además sabemos que desempeñan un papel fundamental en la modulación del comportamiento celular normal y en la comunicación celular<sup>7</sup>.

La actividad de MMP-2 y MMP-9 (MMP conocidas también como gelatinasas) se regula a varios niveles, incluyendo la transcripción, secreción, activación e inhibición por inhibidores de tejido de metaloproteinasas (TIMP). La



sobreproducción de MMP por tumores que interactúan con los sistemas vascular y linfático podría dar lugar a niveles más altos de MMP y TIMP, no solo en los tejidos, sino también en otros fluidos biológicos, tales como la sangre o la orina. Muchos estudios han subrayado la sobreexpresión de MMP y TIMP en la neoplasia vesical<sup>6-13</sup>. Nuestro grupo ha investigado un nuevo abordaje para evaluar la actividad de MMP empleando RT-PCR a tiempo real en células mononucleares de sangre periférica, con énfasis especial sobre la amplificación génica de MMP-9, MMP-2 y TIMP-2 en controles sanos y pacientes con neoplasia vesical<sup>14</sup>. En esa misma población de pacientes pretendemos validar la información que proporciona la determinación sérica de los niveles proteicos de esos mismos marcadores, con intención de evaluar mejor su papel en la estadificación molecular y predicción de pronóstico de la enfermedad, empleando una determinación cuantitativa.

### Material y método

El estudio se llevó a cabo con 42 sujetos, controles de edad y género emparejados por individuos sanos (n = 11) y pacientes con neoplasia vesical (n = 31) diagnosticados y tratados en nuestro centro. En todos los pacientes con cáncer se llevó a cabo estudio histopatológico según los criterios de la OMS y la estadificación de la enfermedad según los criterios de la AJCC 2006. Todos los pacientes dieron su consentimiento para donar material biológico, de acuerdo con los requisitos del Comité Ético de Investigación Clínica del centro.

Bajo condiciones asepticas en el momento de la inducción anestésica se obtuvieron muestras de sangre de cada sujeto a estudio empleando tubos de plástico (tubos BD cat#366703) sin activador de coágulo que evita la liberación de gelatinasas durante la activación plaquetaria y que coagula a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron en menos de 30' después de la extracción a 1.600 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se congeló a -80°C hasta el análisis. Cada alícuota se empleó en una única ocasión para evitar la activación enzimática debida al proceso de congelación-descongelación.

Se determinaron MMP-2, MMP9 y TIMP-2 séricas mediante técnica de ensayo por inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) empleando los reactivos de la compañía R&D

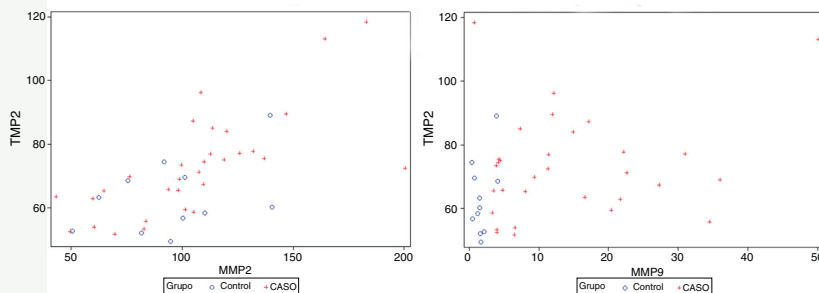
Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA (MMP2: Cat# DMP2F0; MMP9: Cat# DMP900 y TIMP2: Cat# DTM200) siguiendo las especificaciones técnicas del fabricante. Cada grupo de muestras se analizó por triplicado en cada placa de ELISA.

Se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo de la serie y se comparó la homología entre grupos y controles para edad y sexo. Se compararon las medianas para los diferentes valores entre grupos mediante U-Mann Whitney (2 grupos) y Kruskal Wallis (más de 2 grupos). Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . En las variables que determinaron diferencias entre casos y controles se estudió la capacidad diagnóstica para diferenciar pacientes con cáncer y controles mediante análisis de características receptor operador (ROC). Los análisis se realizaron empleando el paquete integrado *Statistical Analysis System* (SAS) de SAS Institute Inc.

### Resultados

El estudio se llevó a cabo con 42 sujetos (36 varones y 6 mujeres), con edad media de 64 años (IC 95%: 59,7-68,3; rango: 29-90), que incluye como control individuos sanos (n = 11) y como caso pacientes con neoplasia vesical (n = 31). Se confirma la equivalencia entre casos y controles con respecto a las variables sexo (test exacto de Fisher,  $p = 0,64$ ) y edad (F de Snedecor,  $p = 0,64$ ). La distribución por categoría T de los pacientes con neoplasia fue: T<sub>a</sub> (n = 7), T<sub>1</sub> (n = 8), T<sub>2</sub> (n = 7), T<sub>3</sub> (n = 4) y T<sub>4</sub> (n = 5). Todos los pacientes recibieron resección transuretral primaria de la neoplasia vesical y 10 también cistectomía. El estudio preoperatorio reveló diseminación metastásica (M1) en 5 casos (16%) y el estudio histopatológico definió 2 tumores grado 1 (6,5%), 6 grado 2 (19,4%) y 23 grado 3 (74,2%).

Existe correlación tanto entre las determinaciones de MMP-2 y TIMP-2 ( $R = 0,699$ ;  $p > 0,0001$ ), así como entre MMP-9 y TIMP-2 ( $R = 0,305$ ;  $p = 0,049$ ) (fig. 1). Ahora bien, no se detectó correlación entre los niveles de MMP-2 y MMP-9 ( $R = 0,126$ ;  $p = 0,43$ ). Los niveles séricos de MMP-9 fueron significativamente mayores en pacientes con cáncer que en el grupo control (U Mann-Whitney;  $p < 0,0001$ ). Los niveles de TIMP-2 también fueron significativamente mayores en pacientes con cáncer ( $p = 0,047$ ), pero no así los

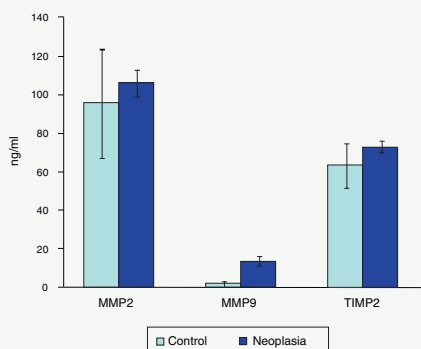


**Figura 1** Correlación detectada entre las determinaciones de MMP-2 y TIMP-2 en la serie total (A); así como entre MMP-9 y TIMP-2 (B).

**Tabla 1** Valores séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y sus respectivos cocientes

Grupo	N	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-2	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/TIMP-2
Total	42	101,24 ± 37,36	5,67 ± 13,21	68,78 ± 18,26	1,46 ± 0,43	0,08 ± 0,15
Control	11	94,84 ± 34,62	1,54 ± 1,39	60,23 ± 16,84	1,56 ± 0,78	0,02 ± 0,03
Neoplasia	31	105,37 ± 37,26	11,33 ± 17,48	71,34 ± 14,71	1,45 ± 0,42	0,13 ± 0,24
		p=0,35	p<0,0001	p=0,047	p=0,45	p<0,001

Los valores se expresan en Medianas ± rango intercuartílico. El valor de p corresponde al test U de Mann-Whitney. Los valores en negrita alcanzan significación estadística.

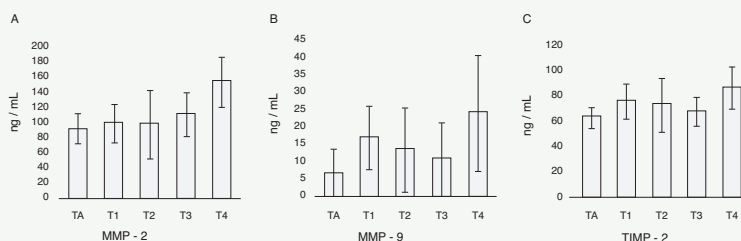
**Figura 2** Comparación de los niveles séricos de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 entre controles y pacientes con neoplasia.

niveles de MMP-2 ( $p=0,35$ ) (fig. 2). Tampoco lo fueron los valores del cociente MMP-2/TIMP-2 ( $p=0,45$ ), pero sí existieron diferencias en el cociente MMP-9/TIMP-2 ( $p<0,001$ ) (tabla 1).

En los pacientes con cáncer no se aprecian diferencias en los niveles de MMP-2, MMP-9 o TIMP-2 con respecto al sexo o a la edad de los pacientes (tabla 2). Ahora bien, sí se detectan diferencias de carácter significativo entre las categorías T para los valores de MMP-2 (Kruskal-Wallis;  $p=0,02$ ) y de MMP-9 ( $p=0,038$ ). También se aprecian diferencias

relativas a los niveles de TIMP-2 para las categorías T, pero sin alcanzar significación estadística ( $p=0,057$ ). Los valores más elevados de MMP-2 corresponden a tumores T3 y T4, y los de MMP-9 y TIMP-2 a tumores T4 (tabla 2, fig. 3). Tampoco se detectan diferencias relativas a los cocientes MMP-2/TIMP-2 ( $p=0,1$ ) o MMP-9/TIMP-2 ( $p=0,08$ ). Con respecto a la categoría M los niveles de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 fueron más elevados en pacientes metastásicos al diagnóstico, pero solo alcanzó significación estadística la diferencia entre los valores de TIMP-2 (U Mann-Whitney;  $p=0,04$ ), y no para MMP-2 ( $p=0,06$ ) o MMP-9 ( $p=0,52$ ) (tabla 2, fig. 4). Tampoco discriminaron entre pacientes con o sin metástasis los cocientes MMP-2/TIMP-2 ( $p=0,573$ ) o MMP-9/TIMP-2 ( $p=0,707$ ). Ninguno de los compuestos analizados muestra diferencias en los diferentes grupos de pacientes con cáncer según el grado histológico (tabla 2).

El análisis mediante curvas ROC reveló que tanto MMP-9 (ABC = 0,95; IC 95% 0,89-1,0) como el cociente MMP-9/TIMP-2 (ABC = 0,95; IC 95% 0,88-1,0) discriminan pacientes con cáncer y controles, con equivalente exactitud diagnóstica. Ahora bien, la capacidad de TIMP-2 para establecer dicha discriminación fue menor (ABC = 0,7; IC 95% 0,52-0,89) (fig. 5). La diferencia entre áreas bajo la curva fue estadísticamente significativa entre MMP-9 y TIMP-2 (Z test;  $p=0,009$ ) y entre MMP-9/TIMP-2 y TIMP-2 ( $p=0,015$ ). El punto de corte para MMP-9 de 3,93 ng/ml proporcionó discriminación entre pacientes con cáncer y controles, con una sensibilidad y especificidad para predecir la ocurrencia de cáncer en esta serie del 90 y 81%, respectivamente. De forma similar, el punto de corte óptimo para MMP-9/TIMP-2 fue 0,053 ng/ml, con sensibilidad del 96% y especificidad del 84% (tabla 3).

**Figura 3** Comparación de los niveles séricos de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 para las diferentes categorías T (AJCC 2006).

**Tabla 2** Valores séricos de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 y sus respectivos cocientes en pacientes con neoplasia vesical según las variables clínico-patológicas

Variable	N	MMP-2 (ng/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MMP-2/TIMP-2	MMP-9/TIMP-2
<b>Sexo</b>						
Hombre	27	107,59 ± 43,19	11,38 ± 17,73	72,4 ± 14,12	1,45 ± 0,42	0,13 ± 0,24
Mujer	4	99,79 ± 33,68	5,69 ± 10,1	62,54 ± 19,29	1,41 ± 0,46	0,08 ± 0,15
			p = 0,26	p = 0,29	p = 0,79	p = 0,38
<b>Edad</b>						
< 65 años	18	103,22 ± 72,24	11,66 ± 17,61	68,44 ± 17,59	1,48 ± 0,51	0,15 ± 0,27
≥ 65 años	13	108,55 ± 14,95	9,4 ± 10,1	73,54 ± 10,31	1,42 ± 0,24	0,13 ± 0
		p = 0,72	p = 0,81	p = 0,49	p = 0,95	p = 0,72
<b>T</b>						
Ta	7	98,2 ± 22,62	3,98 ± 1,27	65,54 ± 17,99	1,49 ± 0,2	0,07 ± 0,02
T1	8	106,8 ± 39,18	14,7 ± 12,22	77,31 ± 22,02	1,24 ± 0,35	0,17 ± 0,19
T2	7	98,81 ± 49,48	9,4 ± 16,25	69,0 ± 14,87	1,43 ± 0,45	0,13 ± 0,29
T3	4	114,34 ± 38,24	5,48 ± 12,55	71,29 ± 15,83	1,6 ± 0,26	0,09 ± 0,21
T4	5	147,03 ± 38,47	14,94 ± 19,01	84,05 ± 12,46	1,63 ± 0,19	0,18 ± 0,25
		p = 0,02	p = 0,04	p = 0,06	p = 0,1	p = 0,08
<b>M</b>						
M0	26	103,22 ± 30,13	9,73 ± 17,61	68,2 ± 17,39	1,44 ± 0,38	0,13 ± 0,24
M1	5	136,88 ± 27,02	11,99 ± 5,54	84,05 ± 14,02	1,45 ± 0,22	0,13 ± 0,04
		p = 0,06	p = 0,52	p = 0,04	p = 0,57	p = 0,71
<b>Grado</b>						
G1	2	74,66 ± 50,16	3,97 ± 0,08	63,04 ± 21,01	1,15 ± 0,41	0,06 ± 0,02
G2	6	99,53 ± 25,8	11,78 ± 12,38	71,36 ± 24,48	1,31 ± 0,34	0,14 ± 0,12
G3	23	109,72 ± 48,4	11,33 ± 18,22	71,34 ± 14,12	1,49 ± 0,31	0,13 ± 0,28
		p = 0,18	p = 0,21	p = 0,68	p = 0,12	p = 0,27

Los valores se expresan en medianas ± rango intercuartílico. El valor de p corresponde al test U de Mann-Whitney cuando se comparan 2 variables y al test de Kuskal-Wallis cuando se comparan > 2. Los valores en negrita alcanzan significación estadística.

## Discusión

Numerosos autores han estudiado el papel de las MMP y más específicamente de las gelatinasas (MMP-2 y/o MMP-9) en la neoplasia vesical, aplicándose abordajes diferentes para estudiar la actividad de estas enzimas de degradación de la MEC<sup>5</sup>. No obstante, cada vez somos más conscientes de que estas sustancias están menos relacionadas con la matriz, como inicialmente se interpretó, y que se trata de una clase de enzimas de carácter ubicuo relacionadas con la propia comunicación entre células<sup>7</sup>. No es de extrañar por tanto el papel que desempeñan en enfermedades

cardiovasculares, neurodegenerativas y en la progresión tumoral<sup>15</sup>.

Existe un proceso regulatorio entre metaloproteinasas e inhibidores de tejido en la progresión tumoral y desarrollo de metástasis<sup>15,16</sup>. La expresión génica y la activación de MMP se relacionan con el potencial de invasión de las células neoplásicas. Inicialmente se consideró que las MMP eran producidas exclusivamente por células tumorales. Este concepto fue sustituido por la más extendida creencia de que algunas MMP son producidas principalmente por el estroma; por ejemplo, la estromelisin (MMP-3) la producen los fibroblastos tumorales. De manera similar, TIMP-1 y

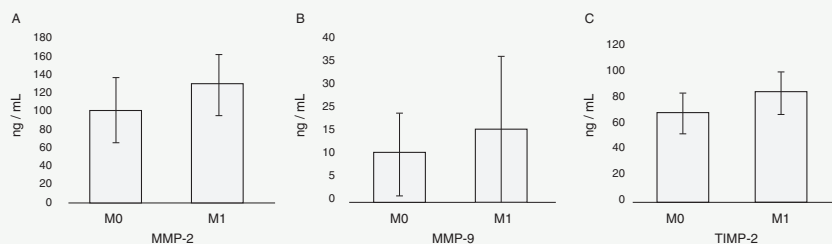
**Figura 4** Comparación de los niveles séricos de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2 para las diferentes categorías M (AJCC 2006).

Tabla 3 Puntos de corte para MMP-9 y MMP-9/TIMP-2 al discriminar cáncer y control

Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VP	VN	FP	FN
<b>MMP-9 (ng/ml)</b>						
7,37	61,29	61,29	19	11	0	12
4,1	80,65	71,55	25	10	1	6
3,93	<b>90,32</b>	<b>81,23</b>	28	10	1	3
3,39	96,77	42,23	30	5	6	1
0,73	96,77	14,96	30	2	9	1
<b>MMP-9/TIMP-2</b>						
0,124	61,29	61,29	19	11	0	12
0,059	77,42	68,33	24	10	1	7
0,053	<b>96,77</b>	<b>87,68</b>	30	10	1	1
0,033	96,77	60,41	30	7	4	1
0,010	96,77	14,96	30	2	9	1

Los valores marcados en negrita son los puntos óptimos que muestran valores de máxima sensibilidad y especificidad.

TIMP-2 tanto en células neoplásicas como estromales se producen contrarrestando la actividad colagenasa y gelatinasa (fig. 6). Esta familia inhibidora promueve la proliferación tumoral o induce apoptosis en algunos sistemas e inhibe el crecimiento tumoral y promueve la muerte celular en otros<sup>16</sup>. Esta aparente respuesta contradictoria de TIMP-2, que por una parte actúa como factor de crecimiento y facilita el desarrollo de la metástasis mientras por otro lado inhibe la angiogénesis, se reconoce como respuesta homeostática a una expresión de MMP-2 elevada<sup>6</sup>. La expresión de estas sustancias puede estudiarse de forma muy diversa, evaluando su presencia en tejido neoplásico y en estroma sano que interacciona con el propio entorno tumoral, en la orina de los pacientes, en el suero, e incluso en células mononucleares de sangre periférica<sup>5,14</sup>.

Diferentes estudios han confirmado que la expresión inmunohistoquímica (IHQ) de MMP conlleva un papel

pronóstico en el cáncer de vejiga. Grignon et al. fueron pioneros en definir que la expresión elevada de TIMP-2, tanto en células neoplásicas como en el estroma circundante, se relaciona con peor supervivencia cuando se asocia a pérdida de inmunotinción de colágeno del tipo IV<sup>8</sup>. Otros trabajos confirmaron que la expresión IHQ de MMP-9<sup>17,18</sup>, MMP-2<sup>19,20</sup>, MMP-7<sup>21</sup> en tejido parafinado conlleva implicaciones de peor pronóstico. Un análisis de 1.176 genes relacionados con cáncer vesical demostró expresión de MMP-2 y TIMP-2 mediante RT-PCR en tejido en todos los pacientes que fallecieron por la enfermedad<sup>22</sup>. Por todo ello, existe un importante cuerpo de conocimiento que soporta el hecho de que la expresión de MMP en tejido constituye un paso fundamental en la progresión tumoral del cáncer de vejiga<sup>5,15</sup>.

No obstante, desde el punto de vista clínico, el interés por detectar en fluidos biológicos este tipo de marcadores y de evaluar en su correcta medida las implicaciones que supone su determinación en orina o en suero supone aún un campo de mayor interés con implicaciones importantes en el diagnóstico, evaluación de pronóstico y monitorización de la enfermedad. Empleando zimografía en gelatina cuantitativa se confirmó la detección en orina de MMP-2 y MMP-9 en tumores vesicales<sup>11</sup> y su correlación con el estadio y el grado tumoral<sup>23-25</sup>; incluso hasta el punto de sugerir el empleo de MMP-9 urinario como posible marcador para el control evolutivo de los pacientes<sup>13</sup>. Otros autores midieron la expresión de gelatinasas en células vesicales exfoliadas y descubrieron una correlación significativa entre la expresión de pro-MMP-9 y la detección de neoplasia<sup>24</sup>. El estudio mediante técnicas de ELISA en el sobrenadante de la orina posiblemente sea el más sencillo de llevar a cabo y uno de los más investigados<sup>17,26</sup>. Eissa et al. mostraron que la detección de MMP-9 puede ser útil para aumentar la sensibilidad de la citología de orina<sup>27</sup>. Otros autores plantearon también que este marcador en orina se correlaciona con el estadio y con el tamaño tumoral<sup>18</sup>. Offersen et al., más recientemente, defienden que la determinación de MMP-9 en la orina de los pacientes con cáncer vesical es incluso un factor independiente de pronóstico<sup>28</sup>.

También se han llevado a cabo estudios serológicos mediante la técnica de ELISA para determinar niveles de MMP y otras sustancias relacionadas. Naruo et al. descubrieron que pacientes con tumores avanzados o metastásicos

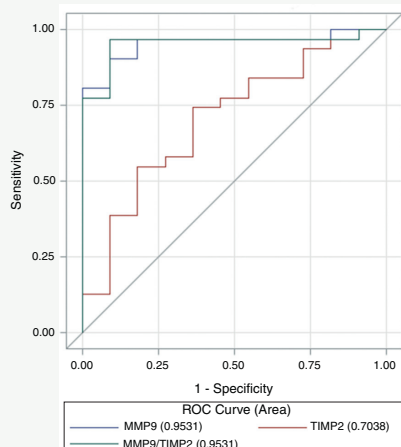
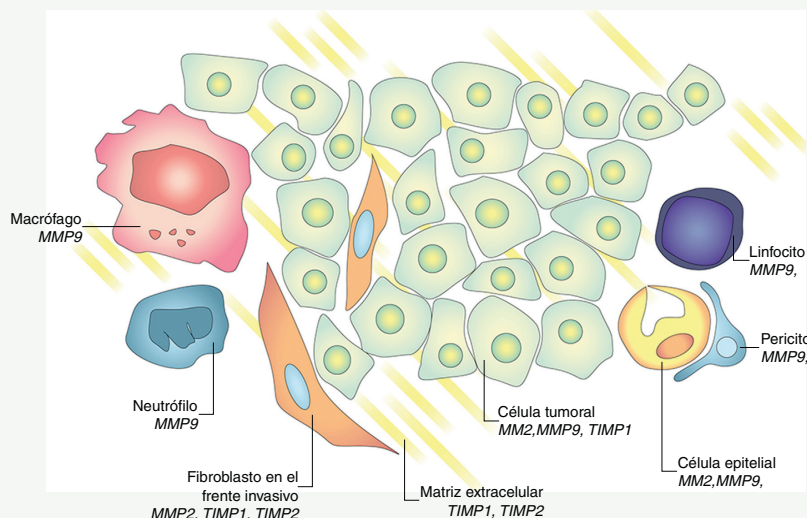


Figura 5 Curva ROC para MMP-9, MMP-9/TIMP-2 y TIMP-2, con sus respectivas áreas bajo la curva especificadas.



**Figura 6** Esquema que representa las principales fuentes de producción de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 en pacientes con cáncer de vejiga.

tenían casi el doble del nivel TIMP-1 en comparación con controles<sup>29</sup>. Inicialmente Gohji et al. no hallaron ninguna diferencia en niveles circulantes de MMP-2 entre neoplasia superficial y controles, aunque sí detectaron niveles de MMP-2 más elevados en enfermedad avanzada<sup>9</sup>. Más tarde, el mismo grupo documentó que un riesgo de recurrencia y progresión elevado era proporcional a la relación de MMP-2/TIMP-2<sup>10</sup>. En este sentido, la determinación sérica de MMP-9 se reconoce como un factor molecular que favorece la génesis y predice la progresión de cáncer vesical<sup>30</sup> y de cáncer de mama<sup>31,32</sup>. También se ha propugnado que la ratio MMP-2/TIMP-2, calculada mediante ELISA en suero, se asocia a cáncer de vejiga con peor pronóstico<sup>33</sup>; e incluso que la ratio MMP-9/TIMP-1 es un factor predictivo de recurrencia en cáncer vesical no músculo-invasivo<sup>18</sup>.

Estos datos parecen altamente concordantes con los que detecta nuestra serie. Confirmamos el papel de MMP-9 y de TIMP-2 para la predicción del desarrollo y progresión del cáncer vesical. De hecho, en nuestra experiencia la detección de MMP-9 y también la determinación del cociente MMP-9/TIMP-2 mediante la técnica de ELISA se comportan como marcadores clínicos de utilidad para la detección de la enfermedad. MMP-9 y MMP-2 aumentan sus niveles en pacientes con lesiones más avanzadas y TIMP-2 aumenta también en la enfermedad que se presenta metastásica al diagnóstico. Por ello, estos resultados refuerzan los ya observados mediante la detección de ARNm de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2, empleando RT-PCR a tiempo real en células mononucleares de sangre periférica de estos mismos pacientes<sup>14</sup>. Se corrobora el hallazgo de que la actividad gelatinasa, especialmente corregida por la actividad TIMP-2, supone una forma nueva de entender la estadificación molecular del cáncer vesical empleando marcadores no

específicos de cáncer vesical<sup>14,34</sup>. La técnica de ELISA para determinar niveles proteicos de MMP-9 y de TIMP-2 supone una medición mucho más sencilla y cuantitativa que la de los niveles de ARNm de estos mismos elementos mediante RT-PCR a tiempo real que ofrece solamente una determinación semicuantitativa; es decir, comparativa entre grupos de forma relativa. Además, son esperables ciertas discrepancias entre los niveles de ARNm en estado constante y la correspondiente actividad enzimática por diferente regulación a nivel postranscripcional. Proponemos unos puntos de corte de MMP-9 y MMP9/TIMP-2 que permiten discriminar eficazmente pacientes con cáncer y controles sanos. Posiblemente, si aplicamos criterios de eficiencia, sea mejor basar esta distinción en la determinación aislada de MMP-9, lo que supone una reducción importante del coste sin pérdida de exactitud diagnóstica.

Debemos insistir que MMP-9 no es un marcador de neoplasia, sino de ambiente tumoral; por lo que no es plenamente específico de cáncer. De hecho, la función de MMP en condiciones no neoplásicas con abundante angiogénesis como la gestación, la curación de lesiones o diversas enfermedades inflamatorias ha sido bien documentada<sup>31,35</sup>. MMP-9 se expresa predominantemente en neutrófilos, macrófagos y mastocitos, más que en células neoplásicas propiamente dichas<sup>6,31</sup>. La reacción local inflamatoria que suele asociarse a neoplasia avanzada también podría estimular la sobreexpresión de MMP-2, MMP-9 y TIMP-2. Así entendida, la reacción inflamatoria se comportaría como cómplice de la carcinogénesis y/o de la progresión tumoral<sup>6</sup>. La actividad global MMP-9 del huésped podría contribuir a potenciar tanto la neovascularización como la invasión tumoral<sup>36</sup>.

Desde luego que la presencia de metástasis o de células tumorales circulantes podría contribuir al aumento

de expresión de gelatinasa en pacientes con tumores avanzados; sin embargo, esta circunstancia no justifica los hallazgos en controles sanos o en pacientes con neoplasia genuinamente superficial (Ta), sujetos que muestran también niveles detectables. Este hecho limita en gran medida la especificidad de este nuevo marcador. Evidentemente, a pesar del cuerpo de evidencia en aumento, estos resultados preliminares deben ser tomados con precaución y han de corroborarse mediante estudios multicéntricos prospectivos a mayor escala que evalúen el papel de este marcador para el diagnóstico y la estadificación molecular del cáncer vesical.

### Financiación

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por una ayuda económica promovida por IPSEN Pharma.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran ningún conflicto de interés.

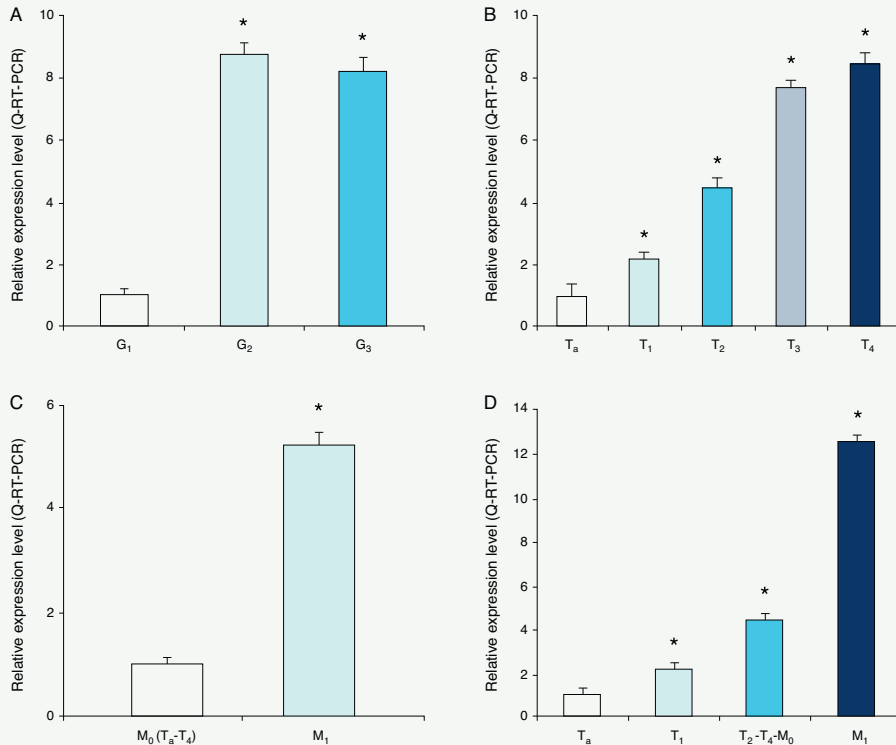
### Agradecimientos

A Juan Dorado (Project Manager, Biostatistics, PeRTICA) por el apoyo estadístico y a José Domínguez (Servicio de Documentación Médica, Hospital Universitario de Getafe) por el soporte iconográfico.

### Bibliografía

- Angulo JC, López JI, Larrinaga JR, Flores N. Metastasising carcinoma of the urinary bladder presenting as a retro-orbital mass. *Scand J Urol Nephrol*. 1991;25:83-4.
- Angulo JC, López JI, Flores N, Toledo JD. The value of tumor spread, grading and growth pattern as morphologic predictive parameters in bladder carcinoma. A revision of 1987 TNM Classification. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1993;119:578-93.
- Andrés G, Ashour N, Sánchez-Chapado M, Ropero S, Angulo JC. El estudio de la metilación del ADN en el cáncer urológico: presente y futuro. *Actas Urol Esp*. 2013;37:368-75.
- Goodison S, Rosser CJ, Urquidí V. Bladder cancer detection and monitoring: Assessment of urine- and blood-based marker tests. *Mol Diagn Ther*. 2013;17:71-84.
- Rodríguez-Faba O, Palou-Redorta J, Fernández-Gómez JM, Algaba F, Eiró N, Villavicencio H, et al. Matrix metalloproteinases and bladder cancer: What is new? *ISRN Urol*. 2012;2012:581539. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/581539>.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LY. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science*. 2002;295:2387-92.
- McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol*. 2011;13:534-40.
- Grignon DJ, Sakr W, Toth M, Ravery V, Angulo J, Shamsa F, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res*. 1996;56:1654-9.
- Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, Komiyama T, Okawa J, Nakajima M. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Res*. 1996;56:3196-8.
- Gohji K, Fujimoto N, Ohkawa J, Fujii A, Nakajima M. Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. *Br J Cancer*. 1998;77:650-5.
- Moses MA, Wiederschain D, Loughlin KR, Zurakowski D, Lamb CC, Freeman MR. Increased incidence of matrix metalloproteinases in urine of cancer patients. *Cancer Res*. 1998;58:1395-9.
- Rodríguez Faba O, Fernández-Gómez JM, Palou Redorta J, Escaf Barmadah S, Vizoso F, Villavicencio Mavrich H. Significance of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) in invasive bladder cancer: Correlation with pathological parameters. *Urol Int*. 2007;78:140-4.
- Fernández CA, Wszolek MF, Loughlin KR, Libertino JA, Summerhayes IC, Shuber AP. A novel approach to using matrix metalloproteinases for bladder cancer. *J Urol*. 2009;182:2188-94.
- Angulo JC, Ferruelo A, Rodríguez-Barbero JM, Núñez C, Ramón de Fata F, González J. Detección y estadificación molecular del cáncer vesical mediante RT-PCR a tiempo real para gelatinasas (MMP-2 MMP-9) y TIMP-2 en sangre periférica. *Actas Urol Esp*. 2011;35:127-36.
- Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S, et al. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012;33:119-208.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*. 2010;20:161-8.
- Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Yoshida O. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J Urol*. 1999;161:1359-63.
- Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, Rajjyabun PH, Robinson MC, Neal DE, et al. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2576-82.
- Vasala K, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. *Urology*. 2003;62:952-7.
- Sumi T, Yoshida H, Hyun Y, Yasui T, Matsumoto Y, Hattori K, et al. Expression of matrix metalloproteinases in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol Rep*. 2003;10:345-9.
- Szarvas T, Becker M, Dorp FV, Gethmann C, Tötsch M, Bánkfalvi A, et al. Matrix metalloproteinase-7 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in bladder cancer. *Cancer Sci*. 2010;101:1300-8.
- Grimm MO, Modlich O, Brosius U, Struse K, Bojar H, Vogeli TA. Expression and progression pattern of transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2000;4:557.
- Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, et al. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res*. 1993;53:5365-9.
- Bianco FJ, Gervasi DC, Tiguert R, Grignon DJ, Pontes JE, Crissman JD, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in bladder washes from bladder cancer patients predicts pathological stage and grade. *Clin Cancer Res*. 1998;4:3011-6.
- Kanda K, Takahashi M, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S. The role of the activated form of matrix-metalloproteinase-2 in urothelial cancer. *Br J Urol Int*. 2000;86:553-7.
- Monier F, Mollier S, Guillot M, Rambeaud JJ, Morel F, Zaoui P. Urinary release of 72 and 92 kDa Gelatinases, TIMP-2. N-GAL and conventional prognostic factors in urothelial carcinomas. *Eur Urol*. 2002;42:356-63.

27. Eissa S, Labib RA, Mourad S, Kamel K, El-Ahmady O. Comparison of telomerase activity and matrix metalloproteinase-9 in voided urine and bladder wash samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Eur Urol*. 2003;44:687-94.
28. Offersen B, Knap MM, Horsman MR, Verheijen J, Hanemaaijer R, Overgaard J. Matrix metalloproteinase-9 measured in urine from bladder cancer patients is an independent prognostic marker of poor survival. *Acta Oncol*. 2010;49:1283-7.
29. Naruo S, Kanayama H, Takigawa H, Kagawa S, Yamashita K, Hayakawa T. Serum levels of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bladder cancer patients. *Int J Urol*. 1994;1:228-31.
30. Guan K, Ye H, Yan Z, Wang Y, Hou S. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2003;61:719-23.
31. Stankovic S, Konjevic G, Gopcevic K, Jovic V, Inic M, Jurisic V. Activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of breast cancer patients. *Pathol Res Pract*. 2010;206:241-7.
32. Patel S, Sumitra G, Koner BC, Saxena A. Role of serum matrix metalloproteinase-2 and -9 to predict breast cancer progression. *Clin Biochem*. 2011;44:869-72.
33. Vasala K, Turpeennniemi-Hujanen T. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and matrix metalloproteinase-2 in complex with the inhibitor (MMP-2:TIMP-2) as prognostic markers in bladder cancer. *Clin Biochem*. 2007;40:640-4.
34. López JI. Comentario a: «Detección y estadificación molecular del cáncer vesical mediante RT-PCR a tiempo real para gelatinasas (MMP-2, MMP-9) y TIMP-2 en sangre periférica». *Actas Urol Esp*. 2011;35:137.
35. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:121-31.
36. Masson V, de la Ballina LR, Munaut C, Wielockx B, Jost M, Maillard C, et al. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J*. 2005;19:234-6.



**Figura 5** A. Cuantificación relativa usando el índice  $[(MMP-9 + MMP-2) - TIMP-2] / (MMP-9 + MMP-2)$  ARNm en células de sangre periférica de pacientes con cáncer vesical de diferente grado histológico. B. Clasificación clínica T. C. Estado metastático. D. Estadío tumoral. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (unidades arbitrarias) contra muestra de referencia (\* $p < 0,05$ ).

débil se mostró dentro del estroma. No pudimos identificar una correlación entre expresión y estadio MMP-2 o MMP-9. Sin embargo, las lesiones eran uniformemente carcinomas músculo-invasivos de alto grado. Además, la expresión de gelatinasa no se pudo correlacionar con la supervivencia. Se detectó TIMP-2 tanto en células neoplásicas como en el estroma, y asociado a la ausencia de inmunotinción de colágeno del tipo IV y con bastante peor supervivencia<sup>5</sup>. El alto nivel de TIMP-2 estromal relacionó con baja supervivencia y fue asociado a la pérdida extensiva de membrana basal. Muchos otros trabajos han evaluado las implicaciones pronósticas de la determinación inmunohistoquímica de componentes MEC en la neoplasia vesical, y básicamente han confirmado los hallazgos de Grignon et al<sup>12,17-20</sup>. La expresión incrementada de MMP-2 y TIMP-2 puede determinar el pronóstico<sup>3-5,9,13,17,19,20</sup>. De hecho, un estudio que analiza 1.176 genes relacionados con el cáncer por RT-PCR en tejidos vesicales cancerosos ha demostrado que MMP-2 y TIMP-2 se expresaron en el 100% de los pacientes que fallecieron como consecuencia de la enfermedad<sup>25</sup>. Investigaciones

sobre otros MMP como matrilisina (MMP-7) también parecen prometedoras para pronosticar el resultado de pacientes con cáncer de vejiga<sup>26</sup>, aunque no se puede decir lo mismo para colagenasa 3 (MMP-13)<sup>27</sup>.

Bianco et al midieron la expresión de gelatinasas en células vesicales exfoliadas y descubrieron una correlación significativa entre expresión de pro-MMP-9 y presencia de neoplasia<sup>7</sup>. Otros autores han investigado MMP-2 y MMP-9 como marcadores de neoplasia vesical, bien empleando zimografía en gelatina, técnicas de inmunotransferencia o ELISA en orina<sup>2,6,12,18</sup>. También se han llevado a cabo estudios serológicos de MMP. Nauro et al descubrieron que pacientes con tumores avanzados o metastásicos tenían casi el doble del nivel TIMP-1 en comparación con controles<sup>28</sup>. Gohji et al no hallaron ninguna diferencia en niveles circulantes de MMP-2 entre neoplasia superficial y controles<sup>4</sup>. Más tarde este grupo refirió un riesgo más alto de recurrencia y progresión cuando la relación MMP-2/TIMP-2 era elevada<sup>8</sup>.

No hay duda de que existe un proceso regulatorio entre metaloproteinasas e inhibidores de tejido en la progresión



